

冬季における浮遊珪藻Chaetoceros neogracile市販濃縮製品を元株とした低コスト大量 培養法

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 公開日: 2024-08-06 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 山田, 徹生, 兼松, 正衛 メールアドレス: 所属:
URL	https://fra.repo.nii.ac.jp/records/2010579

This work is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License.



原著論文

冬季における浮遊珪藻 *Chaetoceros neogracile* 市販濃縮製品を元株とした低コスト大量培養法

山田徹生^{*1}・兼松正衛^{*2}

Low-cost mass culture method using the commercial diatom *Chaetoceros neogracile* as an original strain seed during winter

Tetsuo YAMADA and Masaei KANEMATSU

The aim of this study was to examine the short-term expansion culture of the commercial diatom *Chaetoceros neogracile* as an original strain seed during winter. Water temperature, diatom cell density, illumination intensity, time, and handling stress during pre-treatment were analyzed as explanatory variables that could affect the specific growth rates of the diatom during culture, using linear mixed-effects models. The results indicated that water temperature was the only significant explanatory factor ($p < 0.001$) in the best model for the short-term expansion culture of the diatom. Growth to approximately 100×10^4 cells/mL, which was 12 times the initial diatom density (8×10^4 cells/mL), was observed under continuous lighting and a constant water temperature (20°C) during three days of culture after performing seeding of the original strains into acclimation water (20°C). Simplification of this process and the cost of the culture were also evaluated.

キーワード：浮遊珪藻 *Chaetoceros neogracile*, 冬季大量培養, 市販濃縮製品, 無脊椎動物餌料
2015年5月1日受付, 2016年11月14日受理

我が国の二枚貝, 甲殻類および棘皮動物の種苗生産で餌料として多く用いられ, 餌料価値が高いと認められている微細藻類には, *Pavlova lutheri* (大橋・河本 1980, 林・瀬古 1986, 高島・谷村 1991), *Chaetoceros calcitrans* (中村ら 1991, 久米 2002), *C. neogracile* (旧学名 *C. gracilis*) (Chu 1989, 岡内 2002), *Isochrysis galbana* (鳥羽 2004), *Tetraselmis tetrathere* (中原ら 2005) などがある。中でも, *C. neogracile* (以下「本種」「浮遊珪藻」) は, その特長として高度不飽和脂肪酸を比較的多く含み栄養価が高いこと, 細胞が小型 (4~8µm) で飼育水中に均一に分布するので摂餌され易く消化も良いことなど, 餌料生物としての利点が多い (岡内 2002)。本種の培養適正水温は概ね 20°C であり, 培養は恒温室内で人工光を照射して

行われている場合が多い (鳥羽 2004)。しかし, 培養スペースの制約から, 培養規模は 30~100L 程度の小規模なものに制限され (大橋・河本 1980, 林・瀬古 1986, 高島・谷村 1991, 中島・奥村 2000, 奥村ら 2000), 種苗を量産するために必要な餌料の大量確保を困難にしている。また, 培養に使用する元株を専用の施設で保存し, 必要時に拡大培養しなければならないことも生産現場での作業の負担となっている。その対策として, 国立研究開発法人水産研究・教育機構瀬戸内海区水産研究所伯方島庁舎 (以下当庁舎) では, 冷蔵販売されている本種市販濃縮製品 (1×10^8 cells/mL, A 社製: 以下市販元株, 元株) を元株として, 短期間で大量に培養し, アサリ等の二枚貝用餌料として利用する技術の開発に取り組んできた。

*1 国立研究開発法人水産研究・教育機構瀬戸内海区水産研究所 〒739-0452 広島県廿日市市丸石2丁目17番5号
National Research Institute of Fisheries and Environment of Inland Sea, Fisheries Research and Education Agency, Hatsukaichi,
Hiroshima 739-0452, Japan
tyamad@affrc.go.jp

*2 国立研究開発法人水産研究・教育機構瀬戸内海区水産研究所百島庁舎

本種の市販濃縮製品を元株にした培養については、加藤ら (2004)、兼松ら (2008)、兼松・岡内 (2009) の報告がある。兼松ら (2008) は本種市販元株を利用した自然光下での5月～12月の大量培養事例を報告している。しかし、冬季には気温が低く培養水温もその影響を受けることなどにより大量培養は増殖が悪く、そのため原生動物の食害等の影響も強く受け、いまだ安定した培養技術とはなっていない。特に気温が低い冬季における安定した培養事例はこれまで報告が無かった。冬季における本種の培養の困難を克服すれば、ほぼ周年にわたり無脊椎動物への餌料供給が可能になるものと考えられる。また当庁舎では、これまで培養開始後に原因不明の培養不調が多発していたが (兼松正衛、未発表)、この不調の発生防止対策として、当庁舎にある一般的な種苗生産用建屋 (以下建屋) 内において、市販元株を利用した冬季における大量培養に有効な培養前の前処理法について検討した。また、培養経費を試算し、市販濃縮製品を直接餌料として使用することとのコストを比較検討した。

材料と方法

元株に使用した市販濃縮珪藻 A社から購入した本種市販濃縮製品を通常の冷蔵宅配便により搬入し、元株用として無通気・暗黒かつ5°Cの冷蔵庫内で保存し、搬入後2週間以内に使用した。

海水 実験に使用した海水 (以下培養海水、海水) は、重力式砂ろ過を行った生海水を0.2μm中空子膜ろ過装置 (カネベットUP-250-02カートリッジとアストロポアabs0.2μ EPDM:富士ケミカル (株)) によりろ過し、さらに元株の接種直前に次亜塩素酸ナトリウム (有効塩素濃度24ppm) で30分以上滅菌後、チオ硫酸ナトリウム

で中和した。

水温制御 500Wチタン製棒状ヒーター (TH1-05 100V, アース (株):以下ヒーター) を各実験区の水槽底に設置しサーモスタット (デルサーモ 100V, アース (株)) を用いて、微通気しながら細胞を希釈して馴致させる処理 (以下前処理) 時には設定条件 (表1) のとおりヒーターによる加温 (以下加温) または無加温とした。前処理時の水槽には断熱効果を高めるため、白色の断熱材 (ミラマツト: (株) 田中三次郎商店販売:以下断熱材) を水槽の底面と側面に設置した。

培養実験では、水温を20°Cに加温し、培養水槽上面の断熱効果を高めるため、断熱材を水槽の底面と側面に設置するとともに、外径約100cm、内径60cmの円形ドーナツ型の断熱材を水面に浮かべ、人工光源である高圧ナトリウムランプ (パナゴールド・D NH360-L, 200V, 360W, 耐蝕型密閉器具 YA54033, パナソニック (株):以下ランプ) 上方に外径100cm・内径30cmの外周から中心に1ヵ所切れ込みを入れた傘型の断熱材を設置した (図1)。

施設と水槽 前処理および培養実験は、当庁舎の建屋内で実施した。屋根は透明ポリカーボネイト製波板で、太陽光が通過するものであった。

培養には0.5m³透明ポリカーボネイト製円形水槽 (SPS-500:アース (株):以下0.5m³透明水槽) 8個を使用し、それぞれエアーストン1個により微通気 (約0.5L/分/槽) を行った。

前処理時における実験区の設定:水温, 細胞密度, 水面照度, 処理時間および培養直前のハンドリングの検討 冬季において培養時に高い増殖速度が得られる前処理時の有

表1. 浮遊珪藻大量培養における前処理法検討のための実験設定

実験区分	前処理条件					培養実験	
	水温	細胞密度 (cells/mL)	水面照度	時間 (h) (時間帯)	培養直前のハンドリング	繰り返し (回数)	繰り返し (回数)
実験区1	20°C (加温)	40 × 10 ⁴	遮光処理あり (10lx 未満)	24 (10:00～翌10:00)	ポンプ移槽あり		
実験区2				17 (17:00～翌10:00)			
実験区3				24 (10:00～翌10:00)			
実験区4	11°C (自然水温)	8 × 10 ⁴	遮光処理なし (自然光)	17 (17:00～翌10:00)	ポンプ移槽なし (同じ水槽)	4	4
実験区5				24 (10:00～翌10:00)			
実験区6	11°C (自然水温)	8 × 10 ⁴	遮光処理あり (10lx 未満)	17 (17:00～翌10:00)	ポンプ移槽なし (同じ水槽)	4	4
実験区7				24 (10:00～翌10:00)			
実験区8	前処理なし (5°Cで冷蔵, 細胞密度1 × 10 ⁸ cells/mL, 暗黒, 無通気)				元株を直接接種		

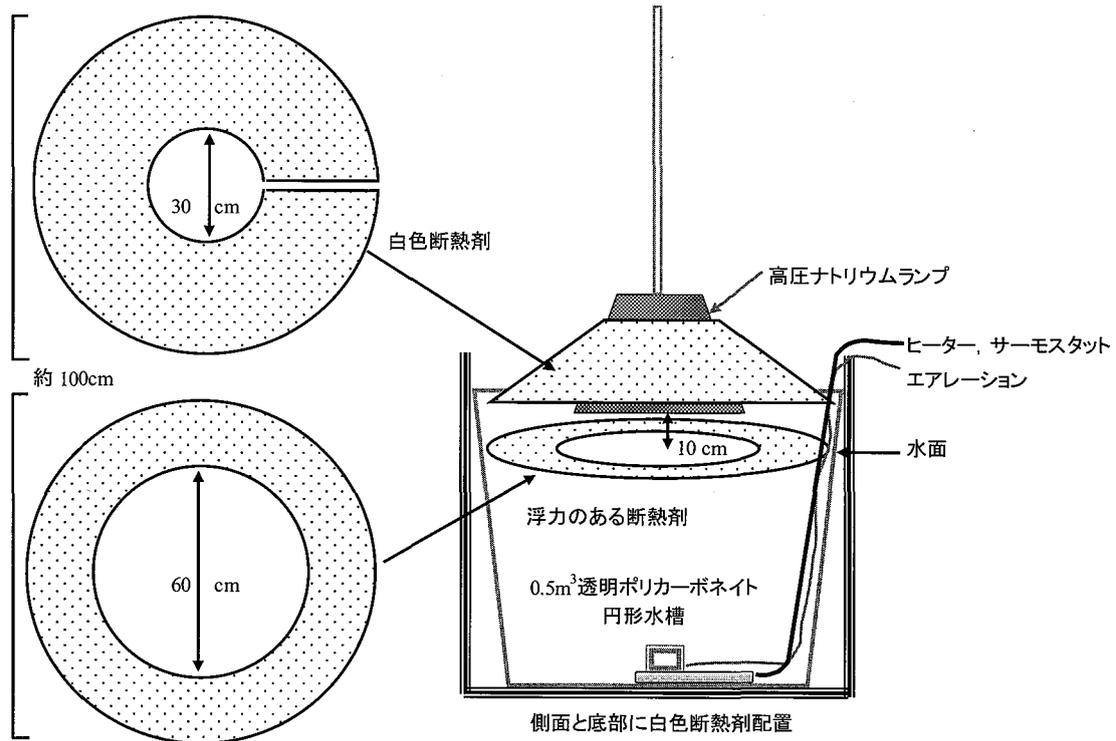


図1. 冬季における浮遊珪藻の培養装置

効な諸要因について検討するため、様態が異なる8種類の実験区を設定し(表1)、培養適水温とされる20°C(鳥羽2004)に加温しながらランプ連続照射による培養実験を行った。すべての実験区について3.25日(78時間)の培養実験を2013年1月30日~2月23日に行った。

実験実施期間と繰り返し手順では、実験を行った建屋内における天気や気温などの自然環境を8実験区間で同等とするため、実験回ごとに各実験区につき1水槽ずつ時系列で繰り返し4回の実験を行った。1回目の実験は、前処理を行った実験区1~7は1月29日~1月30日(前処理)および1月30日~2月2日(培養実験)に、前処理を行わなかった実験区8は1月30日~2月2日(培養実験)に行った。以下同様に、前処理(有無)と培養実験の組み合わせで実験区1~8について、2回目の実験は2月5日~2月9日に、3回目の実験は2月12日~2月16日に、および4回目の実験は2月19日~2月23日に、それぞれ実施した。

実験区1では元株を水温20°Cに加温した海水中(0.5m³ 黒色ポリエチレン円形水槽1個使用)で1/250に希釈(細胞密度40 × 10⁴ cells/mL)し、遮光下(水面直上照度: 10lx未満, 以下同じ)で24時間、前処理(表1)を行った後、水温を20°Cに加温した別の培養用の0.5m³透明水槽に、小型ポンプを用いて細胞密度8 × 10⁴ cells/mLとなるよう移槽し接種した。実験区2~7では実験区1の培養実験に使用したのと同じ0.5m³透明水槽を用い、前処理時における、水温、細胞密度(8 × 10⁴ cells/mL)、水面照度(遮光処理の有無)、処理時間(17時間, 24時間)

および培養開始直前のハンドリング(ポンプ移槽)を行わない条件を設定して、前処理終了後はそのまま培養実験に移した。遮光処理では、円形に切り取り黒色ポリエチレンシートを貼付した断熱剤を水槽の水面に浮かべて上方からの自然光を遮った(表1)。

実験区1~8の培養実験において、培養開始時刻(10時)に後述の栄養塩によって施肥を行い、水温を20°Cに加温し、ランプ連続照射による培養を行った。水温11°Cで前処理を行った実験区6, 7は培養開始とともに水温を20°Cに加温した。また、前処理を行わない対照区(実験区8)を設けた(表1)。

細胞密度はトーマ血球計算盤(エルマ販売(株)販売)を用いて、培養開始後0, 6, 23, 30, 47, 54, 71, 78時間目に光学顕微鏡下で計数した。

データ解析は、実験区毎に培養開始後の細胞密度より、次式により6, 23, 30, 47, 54, 71, 78時間目の比増殖速度を算出した。培養開始後の比増殖速度の時間数は日数に換算した。

$$\mu = (\ln N_t - \ln N_0) / t \quad \text{式(1)}$$

ここで、 μ : 比増殖速度、 N_0 : 培養開始時の細胞密度、 N_t : 培養開始時からt日後の細胞密度である。線形混合効果モデル Linear Mixed-Effects Models (R Core Team 2014; 以下LME)により、比増殖速度に影響する前処理時の要因を解析した。LME解析はR 3.1.2におけるlme4パッケージを使用した。LMEにおいては、応答

変数を培養開始後の比増殖速度とし、説明変数を前処理時の元株馴致時の水温、細胞密度、水面照度、処理時間および培養直前のハンドリングとした(表2)。本実験において、前処理を行わなかった実験区8についてはLME解析データから除外した。赤池情報量基準(AIC)が最小になるモデルを最適モデルとして選択し、モデルに含まれた要因について比増殖速度への影響が認められるかを判断するためF分布の確率関数の値を求めた。本実験の水面照度に関する実験区分において、実験区1と前処理工程の簡便・省力化を検討した実験区2,3,6および7は、前処理時の水槽色がそれぞれ黒と透明であったものの水槽上面を遮光した点で同じ処理を施したとみなし水面照度はいずれも10lx未満の暗条件であり、遮光せず自然光が入射し日中は明条件であった実験区4および5とは区別した。

培養時における細胞の最終到達密度を評価するため、培養終了日(2.96日,71時間後)および3.25日(78時間後)の細胞密度を一元配置分散分析により実験区間で比較した。なお、実験の初期および後期が対数増殖期ではないと考えられる実験区もあったことから、式(1)による計算結果を、以後「みかけの比増殖速度」とした。

栄養塩類 培養時に栄養塩類として用いた肥料組成は兼松・岡内(2009)と同様に、0.5m³当たり硝酸カリウム30g、リン酸2ナトリウム12水和物3g、クレワット32(ナガセテムテックス(株))0.9g、ビタミンB₁₂0.1%水溶性粉末製剤(関東化学(株))0.3gおよびメタ珪酸ナトリウム7.5gとした。肥料は、メタ珪酸ナトリウムとそれ以外の成分を別々にミキサーで水道水に高濃度となるように溶解して保存し、前処理終了後の培養開始時において、所定量となるように培養海水へ添加した。

光制御 培養中はランプを各実験区の0.5m³透明水槽中央直上に1個、防滴ガラス面が水平になるように配置し照度が最大となるようガラス面と水面の距離を約10cmに調節した(図1)。ランプ直下の水面直上の照度をハンディー照度計(IM-2D,10Mフィルター装着,(株)トプコン)で測定したが測定限界値(199,900lx)を超えたため、水面直上0.65m~2.0mの距離内の水面照度の最大値を日中に10点(65,70,80,90,100,110,120,130,

140および200cm)で測定し、距離と照度に関する回帰式を算出して、ランプ照射時の水面直上の照度を推定した。ランプ照射中は、海水の飛沫により塩類が防滴ガラス面に付着することを防ぐため、日中に1回水道水で洗浄した。ランプは培養中連続照射した。

温度および照度の測定 水温は、前処理時および培養時に原則1日2回(9時と16時)、細胞密度測定時にハンディー温度計((株)佐藤計量器製作所)で測定した。水面照度と気温については、実験場所内の1ヵ所において、実験中の0.5m³透明水槽の水面と同じ高さの位置にデータロガー(HOBO U12-012,パシコ貿易(株)販売)を1個設置し、2013年1月29日~2月23日に1時間間隔で測定した。

結 果

前処理時の平均水温は加温を行った実験区1~5は19.9°C~20.4°C、加温を行わなかった実験区6と7が10.7°Cであった。培養開始後、実験区6と7は加温を行ったことで、6時間後の水温は約20°Cとなった。その後、培養終了までの各実験区の平均水温は19.1°C~21.4°Cの範囲であった。前処理時において自然光とした実験区4,5と、培養中の日中の培養水槽水面位置の照度の平均値は71,011lx、最高値は159,823lx(12時)であった。また、19時から翌朝6時までの照度は0lxであった。実験場所の気温は、日中(10時から19時)は6.2~40.1°C(平均18.4°C)、夜(20時から翌朝9時)は3.4~12.9°C(平均7.2°C)の範囲で変動した。培養中の実験区1~8の水面直上照度はランプ連続照射により、常時434,880lxと推定された。

前処理条件が異なる8実験区の培養時の細胞密度を表3に示した。実験区2~7の各実験区において前処理開始時と培養開始時の細胞密度の間に有意差はなかった(それぞれ $p>0.05$)。ただし、みかけの比増殖速度の算出では、式(1)の N_0 値として、培養開始時(実験区1~7)の細胞密度実測値(表3)を用いた(表4)。

上記比増殖速度に影響を及ぼす前処理時の諸要因(水温、細胞密度、水面照度、処理時間および培養直前のハンドリング)についてLME解析を行った結果、有意な

表2. 線形混合効果モデルによる、浮遊珪藻培養時の比増殖速度に及ぼす前処理時の諸要因の設定

要因	定 義	測定量
	前処理時における	
水温	元株の馴致水温:11°Cと20°C	二値
細胞密度	元株の希釈馴致密度: 8×10^4 cells/mLと 40×10^4 cels/mL	二値
水面照度	遮光処理:あり(10lx未満)となし(自然光)	二値
処理時間	元株の馴致時間:17時間と24時間	二値
培養直前のハンドリング	移槽作業:ポンプ移槽あり(水槽→水槽)となし(同じ水槽)	二値

表 3. 異なる条件での前処理後の浮遊珪藻培養時の細胞密度

日数 (時間 h)	平均細胞密度 ($\times 10^4$ cells/mL)							
	実験区 1	実験区 2	実験区 3	実験区 4	実験区 5	実験区 6	実験区 7	実験区 8
0.00 (0)	8.0 (0.0)	8.0 (1.6)	8.3 (1.9)	7.5 (1.7)	10.0 (2.6)	9.3 (1.3)	7.0 (2.4)	8.0 (0.0)
0.25 (6)	7.8 (1.0)	9.0 (1.4)	8.5 (1.0)	7.5 (2.5)	6.0 (1.6)	8.3 (1.0)	8.5 (1.7)	8.3 (2.8)
0.96 (23)	11.3 (4.6)	18.5 (8.7)	15.8 (9.0)	18.0 (6.4)	17.0 (5.4)	7.8 (3.9)	8.0 (4.7)	6.8 (3.9)
1.25 (30)	12.5 (6.4)	32.0 (7.9)	23.5 (12.6)	23.0 (8.1)	19.5 (9.6)	10.5 (2.4)	8.8 (2.8)	10.5 (6.4)
1.96 (47)	41.5 (13.2)	64.8 (11.5)	48.5 (20.9)	71.5 (17.1)	40.3 (18.5)	22.0 (10.0)	14.3 (8.1)	20.8 (6.2)
2.25 (54)	53.5 (17.9)	77.5 (7.0)	61.0 (20.8)	73.0 (17.6)	59.5 (14.9)	40.8 (12.5)	23.8 (11.7)	36.5 (17.7)
2.96 (71)	84.5 (11.6)	101.5 (26.9)	93.5 (28.9)	109.3 (11.3) ^a	85.0 (10.4)	87.0 (24.9)	45.5 ^b (15.2)	76.5 (15.2)
3.25 (78)	105.5 (16.0)	95.3 (12.4)	83.0 (11.7)	91.8 (32.1)	95.3 (9.8)	95.3 (25.0)	57.8 (35.3)	81.0 (15.9)

*実験条件は表 1 を参照

平均細胞密度とは繰り返し 4 回の培養実験における細胞密度データの平均値を示す

平均細胞密度の括弧内の数値は標準偏差を示す。培養最終日である 2.96 日 (71 時間) 後の平均細胞密度の右肩記号は実験区間の細胞密度の有意差を示す (Scheffe 多重比較)。3.25 日 (78 時間) 後は実験区間で差はなかった

表 4. 異なる条件での前処理後の浮遊珪藻培養時の比増殖速度

日数 (時間 h)	平均比増殖速度 (/日)							
	実験区 1	実験区 2	実験区 3	実験区 4	実験区 5	実験区 6	実験区 7	実験区 8
0.25 (6)	-0.15 (0.48)	0.50 (0.48)	0.17 (0.45)	-0.12 (2.22)	-2.06 (0.35)	-0.45 (0.60)	0.93 (2.27)	-0.06 (1.44)
0.96 (23)	0.29 (0.43)	0.78 (0.55)	0.57 (0.55)	0.87 (0.61)	0.54 (0.37)	-0.27 (0.51)	0.09 (0.73)	-0.31 (0.61)
1.25 (30)	0.28 (0.42)	1.10 (0.28)	0.76 (0.36)	0.88 (0.32)	0.49 (0.37)	0.09 (0.30)	0.19 (0.40)	0.13 (0.41)
1.96 (47)	0.82 (0.17)	1.07 (0.01)	0.87 (0.21)	1.15 (0.12)	0.68 (0.21)	0.40 (0.27)	0.31 (0.28)	0.47 (0.15)
2.25 (54)	0.83 (0.13)	1.02 (0.07)	0.88 (0.08)	1.01 (0.10)	0.79 (0.11)	0.65 (0.16)	0.51 (0.21)	0.64 (0.21)
2.96 (71)	0.79 (0.05)	0.86 (0.15)	0.81 (0.10)	0.91 (0.12)	0.73 (0.05)	0.75 (0.13)	0.63 (0.10)	0.76 (0.06)
3.25 (78)	0.79 (0.05)	0.77 (0.08)	0.71 (0.09)	0.76 (0.17)	0.70 (0.06)	0.71 (0.11)	0.60 (0.19)	0.71 (0.06)

*実験条件は表 1 を参照

平均比増殖速度とは繰り返し 4 回の培養実験における比増殖速度データの平均値を示す

平均比増殖速度の括弧内の数値は標準偏差を示す

水槽毎の変量効果 ($\chi^2 = 70.58, df = 2, p < 0.0001$) を持つ最適モデルが選択され、モデルに含まれる要因は水温のみであり、F 分布の確率関数の値より要因は有意であった ($p < 0.001$; 表 5, 図 2)。この結果から、実験区 1~7 のうち、前処理時の水温を 20°C に加温した実験区 1~5 が、前処理時の水温を 11°C とした実験区 6, 7 よりも有意に増殖速度が高いことが明らかとなった。前処理時の細胞密度 ($8 \times 10^4 \sim 40 \times 10^4$ cells/mL)、水面照度 (遮光処理の有無)、処理時間 (17~24 時間) および培養直前のハンドリング (有無) はいずれも最適モ

デルの要因には含まれず、増殖速度に影響する要因とは無関係であった。

培養終了日の細胞密度を比較したところ、前処理時に水温を 20°C に加温した実験区 1~5 の平均細胞密度は 2.96 日および 3.25 日後ではそれぞれ 95×10^4 cells/mL, 94×10^4 cells/mL となり 11.8~11.9 倍増殖したが、前処理時の水温を加温せず 11°C とした実験区 6 と 7 の平均細胞密度は 2.96 日および 3.25 日後ではそれぞれ 66×10^4 cells/mL, 77×10^4 cells/mL となり 8.2~9.4 倍しか増殖しなかった。実験区間で比較すると、2.96 日後におい

表 5. 線形混合効果モデルによる、浮遊珪藻の比増殖速度に影響する前処理時の要因解析結果

応答変数	説明変数	推定値	標準誤差	df	F 値	p 値
比増殖速度	AIC : 301.73	切片	-0.30	0.20		
		水温 (11°C)	-0.30	0.09	1,193	11.52

*前処理時の細胞密度、水面照度、処理時間および培養直前のハンドリングは最適モデルの要因に含まれなかった

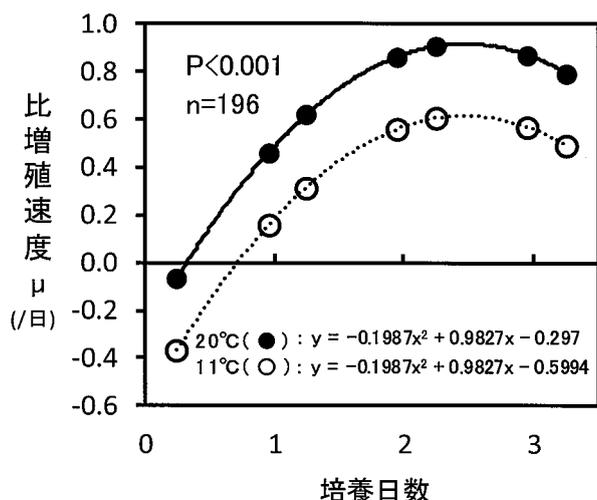


図 2. LME 解析による前処理時有意要因に基づく、浮遊珪藻培養時の比増殖速度最適モデル

て実験区 4 が有意に実験区 7 よりも細胞密度が高くなったが (ANOVA: $p < 0.05$, Scheffe: $p < 0.05$), 3.25 日後には実験区間で細胞密度の差はみられなくなった (ANOVA: $p > 0.05$: 表 3)。前処理を行わなかった実験区 8 は、実験区間の多重比較では細胞密度において有意差はみられなかったものの、2.96 日および 3.25 日後の平均細胞密度が、いずれも最低だった実験区 7 に次いで低かった (表 3)。

考 察

珪藻類やハプト藻類は単細胞であり、二分裂で増殖する。培養開始から枯死までは、誘導期、対数増殖期、定常期および凋落期の過程をたどる。餌料藻類の増殖に必要な条件は一般の植物と同様であり、一定の温度範囲と光量、二酸化炭素および栄養塩類である。これらのうち、特に温度は増殖速度に関係し、光量は培養の最高到達密度に関係する (鳥羽 2004)。光量は、光源の種類や照射方法、培養容器の大きさや形状、攪拌の方法や強さなど様々な要因により変化すると考えられている (鳥羽・深山 1993)。微細藻類では照度が高いほど増殖速度および定常期密度が高いことが認められている (瀬古 1985, 岡内 1988)。

本研究において、LME 解析により、培養時の増殖速度に影響する前処理時の有意な要因は水温のみであり、

細胞密度、水面照度、処理時間および培養直前のハンドリングは無関係であると示唆された (表 5)。これらの結果から、冬季においては培養作業の簡便性や省力化の観点からは前処理から培養まで、そのまま同じ 0.5m³ 透明水槽を用いれば良く、本実験環境の範囲内では水面照度に留意する必要はないものと考えられた。水温を 20°C に加温した海水中に元株を細胞密度 8×10^4 cells/mL で添加し 17~24 時間馴致させた後に施肥を行い、水温を 20°C に維持しながらランプを 3 日間連続照射する培養で、開始密度 (8×10^4 cells/mL) の約 12 倍の増殖が見込めることが明らかになった。

兼松・岡内 (2009) は本種市販元株を利用した大量培養における増殖促進効果を検討し、12 月にランプを使用した場合、培養水温 (自然水温) を 1~2°C 昇温することにより増殖速度が増加し、6.5 日で最高密度 (約 100×10^4 cells/mL) に達したことを報告している。一方、冬季において 12 月よりも気温が低くなる 1~2 月における本種の大量培養の報告はないものの、兼松・岡内 (2009) のランプ照射法では、培養水温が 1~2 月では 12 月よりもさらに低下し、増殖速度の低下・最高密度に達するまでの培養日数の延長および最高密度が低下する可能性がある。これに対して、兼松・岡内 (2009) の方法を改良した本研究の培養法であれば、市販元株を希釈して 20°C の加温海水中で一定時間馴致させる前処理を行うこと、培養時にランプを 24 時間連続照射すること、および加温により培養水温を 20°C に維持することにより、細胞密度約 100×10^4 cells/mL に達するまでの日数を、前処理を含めて 4 日以内に短縮できる点で、速やかな増殖が得られるようになったと言える。本研究の培養方法を導入すれば、培養水温とランプ照射量を適正に維持できることにより、冬季の全期間 (12 月~翌 2 月) にわたり、計画的な大量培養と餌料供給が安定的に行えるものと考えられる。市販元株を利用した浮遊珪藻の大量培養の手順例を図 3 に示したが、一般的な種苗生産現場の勤務時間内に、比較的容易に培養作業が行えるものと思われる。

前処理を行わず市販元株を培養水槽に直接接種した実験区 8 では培養不調は生じなかったが、LME 解析により前処理時の低水温 (11°C) は培養時に高い増殖速度を得るには不適な処理条件であると推定され (表 5, 図 2), 前処理時に 11°C であった実験区 7 の培養終了時の平均

細胞密度は全実験区中で最低値となり、次いで実験区 8 の平均細胞密度が低かったこと (表 3) を考え合わせると、本研究の大量培養法において、水温 20°C に加温した海水中に市販元株を希釈して培養前の一定時間馴致させる前処理はその後の安定的な培養を得るために不可欠な工程であると判断された。

ここで、本研究の冬季における大量培養において 1 回の培養で 12 倍の増殖が得られると仮定すると、1 個の 0.5m³ 透明水槽で細胞密度 96×10^4 cells/mL の培養海水 0.5m³ 分が得られることになり、その収穫量は市販元株 4.8L 分に相当する。1 回の培養に要するコスト試算結果

を表 6 に示したが、電気代や人件費などのランニングコストは 3,445 円、生産高比例法 (小林 2008) により算出された資器材類の原価償却費は 278 円となり、これらのコストを合計すると 3,723 円となった。市販元株 4.8L の対価は 15,120 円であることから、元株を無脊椎動物の餌料として直接給餌する場合と較べて、本研究の簡易大量培養を行った場合には 1 回の培養当たり餌料代が 11,397 円安くなり、コストを 1/4 まで下げることができ、高い費用対効果が見込めることが明らかになった。

当庁舎ではこれまで培養開始後に原因不明の培養不調が多発していたが (兼松正衛, 未発表)、市販元株の保

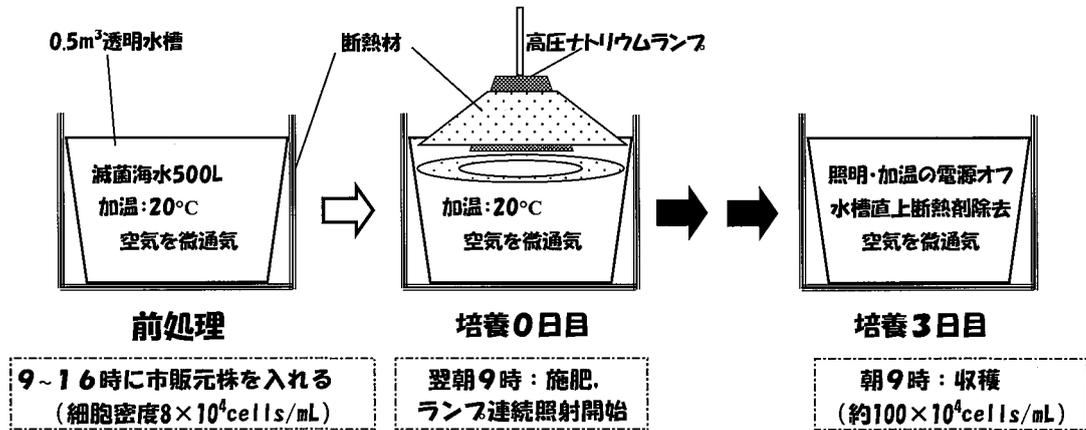


図 3. 冬季における浮遊珪藻の大量培養の手順例

表 6. 冬季における浮遊珪藻の大量培養コスト試算結果

費目* ¹	金額(円)	備考
ランニングコスト		
電気代		
500W チタン製棒状ヒーター 1 本使用料	625	1 回の培養における使用時間数: 96 時間
高圧ナトリウムランプ 1 個使用料	400	1 回の培養における使用時間数: 78 時間
市販元株代		
接種時 0.4L 使用料	1,260	
肥料代		
	35	
人件費		
培養管理作業	1,125	職員 1 名 × 2,000 円 (/ 時) × 0.15 時間 (/ 日) × 3.75 日
小計	3,445	
原価償却費* ²		
(資器材類) 500W チタン製棒状ヒーター 1 本	33	
高圧ナトリウムランプ 1 個	57	
サーモスタット	36	
0.5m ³ 透明ポリカーボネイト製円形水槽 1 個	125	
断熱材	27	100 回培養に使用できると仮定
小計	278	
合計	3,723	

* 1: コスト試算の費目から、施設費 (建屋, 電源設備), 備品費の一部 (0.2μm 中空子膜ろ過装置), 海水代および海水の消毒中和薬品代は除外

* 2: 原価償却費 (円) = [原価 - 残存価格] × [1 回の培養における使用時間数] / [耐用時間数]。残存価格は 1 円とした

存環境（暗黒・冷蔵）は *Chaetoceros* 属浮遊珪藻が休眠細胞となる環境（板倉 2000）と類似するとともに、元株細胞には濃縮製造過程に起因する棘の折れなどが高率で認められる（山田徹生，未発表）。本研究ではこれらの細胞の形態欠損および休眠細胞に類似した状態から増殖が可能となる状態までの期間と培養不調との間の何らかの関連を疑い，培養不調の発生防止対策として培養前の前処理法について検討した。その結果，かつて見られた培養不調は見られなくなった。また，前処理開始時の元株細胞の多くに認められた細胞の棘欠損等も，前処理後にはあまり見られなくなった（山田徹生，未発表）。ただしこれらについて，本研究で詳しく検討したわけではなく，細胞の物理的損傷の修復や増殖生理については未だ不明な点が多く，培養不調との因果関係があるかどうかについては具体的に検討する余地が残されている。

本研究で使用した高圧ナトリウムランプに代わる新たな光源として，発光面からの輻射熱が相対的に少なくランプ寿命の長期化や使用電力の節減が期待できる発光ダイオード（LED）が餌料用微細藻類の培養光源として近年注目されており（石川・磯和 2012，岡内 2013），それらの将来的な大量培養への活用も期待される。本研究では培養水槽に空気を通気したが，より高濃度の細胞到達密度を得るためには二酸化炭素の通気も有効とされており（綿貫ら 2004），コストなども考慮する必要があるものの，今後の検討課題と考えられる。

謝 辞

国際農林水産業研究センターの藤井 徹生 博士，水産研究・教育機構増養殖研究所の島 康弘 氏，瀬戸内海区水産研究所の日向野 純也 博士および米田 道夫 博士には有益な助言を賜りました。厚くお礼申し上げます。

文 献

- 1) Chu K H (1989) *Chaetoceros gracilis* as the exclusive feed for the larvae and postlarvae of the shrimp *Metapenaeus ensis*. *Aquaculture*, **83**, 281-287.
- 2) 林 政博・瀬古慶子 (1986) アコヤガイの種苗生産について. 三重県水産技術センター研究報告, **1**, 39-68.
- 3) 石川 卓・磯和 潔 (2012) 白色発光ダイオード (LED) を用いた餌料用微細藻類の培養. *水産技術*, **4**, 51-55.
- 4) 板倉 茂 (2000) 沿岸性浮遊珪藻類の休眠期細胞に関する生理生態学的研究. *瀬戸内水研報*, **2**, 67-130.
- 5) 兼松正衛・高橋 誠・山崎哲男・桑田 博 (2008) 市販の珪藻 *Chaetoceros gracilis* を元株としたバッチ式培養における増殖率の季節変化. *栽培漁業センター技報*, **7**, 33-36.
- 6) 兼松正衛・岡内正典 (2009) 低照度ならびに低水温期における浮遊珪藻キートセロス類 2 種の高圧ナトリウム灯による

増殖促進効果. *栽培漁業センター技報*, **9**, 40-43.

- 7) 加藤元一・岡内正典・中神秀一 (2004) 珪藻類キートセロス属 2 種の濃縮技術の開発と濃縮細胞の再生. *水産増殖*, **52**, 231-237.
- 8) 小林俊道 (2008) 原価償却のしくみと実務. 株式会社あさ出版, 東京. 193pp.
- 9) 久米 洋 (2002) アカウニ浮遊幼生における *Chaetoceros* 代替餌料の検討. *水産増殖*, **50**, 91-96.
- 10) 中原泰彦・萩原篤志・三矢泰彦・平山和次 (2005) ヌマエビ科両側回遊性エビ科 3 種の幼生飼育に対する飼育餌料および塩分の影響. *水産増殖*, **53**, 305-310.
- 11) 中島幹二・奥村裕弥 (2000) 人工光利用による餌料用微細藻類 *Pavlova lutheri* の培養器大型化に関する考察. *照明学会誌*, **84**, 502-506.
- 12) 中村義治・高越哲男・下園栄昭・山廻邊昭文 (1991) ホッキガイ. 平成 2 年度地域特産種増殖技術開発事業報告書 (二枚貝グループ), 福島, 8-26pp.
- 13) 岡内正典 (1988) テトラセルミス *Tetraselmis tetraele* (West, G.S.) Butcher の大量培養に関する研究. *養殖研究所研究報告*, **14**, 1-123.
- 14) 岡内正典 (2002) 海産魚介類の初期餌料用微細藻類の大量培養技術の開発. *日水誌*, **68**, 625-628.
- 15) 岡内正典 (2013) III - I. 光照射と植物性初期餌料生物の省エネルギー培養. シンポジウム記録 水産における光利用技術と基礎研究の動向. *日水誌*, **79**, 886.
- 16) 奥村裕弥・中島幹二・増田篤稔・高橋光男・向阪信一・河口公俊・松山恵二・村上克介 (2000) *Pavlova lutheri* の大量培養における光強度と細胞密度の関係について. *植物工場学会誌*, **12**, 261-267.
- 17) 大橋 裕・河本良彦 (1980) アカガイ種苗の量産化にともなう技術の開発. *栽培漁業技術開発報告* (山口県内海栽培漁業センター), **6**, 80-135.
- 18) R Core Team (2014). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.
- 19) 瀬古慶子 (1985) *Pavlova lutheri* の培養における照度の影響について. 昭和 59 年度三重県栽培漁業センター事業報告書, 三重, 89-93pp.
- 20) 高島葉二・谷村明俊 (1991) ホッキガイ. 平成 2 年度地域特産種増殖技術開発事業報告書 (二枚貝グループ), 茨城, 7-26pp.
- 21) 鳥羽光晴・深山義文 (1993) イソクリシス・タヒチ株の大量培養 - I. 好適培養条件. *栽培技研*, **21**, 45-53.
- 22) 鳥羽光晴 (2004) アサリ種苗生産の現場基礎技術. 千葉県水産研究センター業績 IV, 98pp.
- 23) 綿貫 啓・廣瀬紀一・門谷 茂 (2004) 藻類増殖用水溶性ガラスを用いた珪藻 *Chaetoceros gracilis* の簡易な半連続培養システムの開発. *水産増殖*, **52**, 11-16.

冬季における浮遊珪藻 *Chaetoceros neogracile* 市販濃縮製品を元株とした低コスト大量培養法

山田徹生・兼松正衛

冬季における浮遊珪藻 *Chaetoceros neogracile* 市販濃縮製品を元株とした大量培養法を検討した。浮遊珪藻の培養時の比増殖速度に影響を与える前処理時の水温、細胞密度、水面照度、処理時間および培養直前のハンドリングを説明変数として線形混合効果モデルにより解析した。その結果、最適モデルの要因は水温のみで、有意 ($p < 0.001$) であると結論づけられた。元株を水温 20°C で馴致処理後、 20°C を維持して3日間高圧ナトリウムランプを連続照射する培養により、細胞密度 ($8 \times 10^4 \text{cells/mL}$) は、約 $100 \times 10^4 \text{cells/mL}$ まで12倍に増加した。培養の省力化とコストについても検討した。

水産技術, 9 (1), 1-8, 2017