

## ナンノクロロプシス培養における炭酸ガス添加効果

|       |                                                                                                     |
|-------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------|
| メタデータ | 言語: Japanese                                                                                        |
|       | 出版者:                                                                                                |
|       | 公開日: 2025-04-24                                                                                     |
|       | キーワード (Ja):                                                                                         |
|       | キーワード (En):                                                                                         |
|       | 作成者: 浜崎, 活幸, 丸山, 敬悟                                                                                 |
|       | メールアドレス:                                                                                            |
|       | 所属:                                                                                                 |
| URL   | <a href="https://fra.repo.nii.ac.jp/records/2014371">https://fra.repo.nii.ac.jp/records/2014371</a> |

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



## ナンノクロロプシス培養における炭酸ガス添加効果

浜崎 活幸<sup>\*1</sup>・丸山 敬悟<sup>\*1</sup>

(1991 年 3 月 23 日受理)

いわゆる海産クロレラは、各地の種苗生産機関でシオミズツボムシ *Brachionus plicatilis* やアルテミア *Artemia* sp. 等の動物性生物餌料の培養餌料や栄養強化素材として、あるいは稚仔魚の飼育水の水作り用として広く利用されており、その培養は種苗生産の出発点とも言える重要な工程である。

いわゆる海産クロレラの分類学的位置についてはほとんど明らかにされていなかったが、最近、その本体は真正眼点藻綱 *Eustigmatophyceae* に属するナンノクロロプシス属の一種で、*Nannochloropsis oculata* またはその近縁種であることが示された<sup>1-3)</sup>。

いわゆる海産クロレラ（以下、ナンノクロロプシス）の培養においては、しばしば培養密度の停滞や細胞のフロック化による細胞密度の急激な減少—いわゆる落ちる<sup>4)</sup>現象（以下、落ち現象）—が起こり、供給に支障をきたすことも多い。従って、依然、高密度・安定培養手法の確立が本種の培養技術における重要な課題となっている。そして、高密度・安定培養を実現するために各地の種苗生産機関で様々な技術開発が試みられているが<sup>5)</sup>、光合成の炭素源として培養水に炭酸ガスを添加することもその一つである<sup>5)</sup>。

日本栽培漁業協会上浦事業場<sup>6)</sup>では、ナンノクロロプシス培養水の pH が 9.5 を越えた時点で短時間自動的に炭酸ガスを添加する方法で大量培養を行ったが、pH 以外の培養条件の影響が大きく、炭酸ガス添加の効果については必ずしも明確ではないと報告している。

一方、広島県水産試験場<sup>7)</sup>では、水温 25°C 以上の高水温期に pH が 0.5 低下するのを目安に短時間炭酸ガスを添加して培養試験を行ったところ、添加区では無添加区の 1.5 倍以上に増殖したことから炭酸ガス添加の効果が認められたと報告している。

また、日本栽培漁業協会玉野事業場<sup>8), \*2, \*3</sup>では、1983 年と 1984 年に炭酸ガスを分子状態で供給する特殊ホース (CO<sub>2</sub> パーム: 日本農興 KK) を用いてナンノクロロプシス培養における炭酸ガス添加効果試験を実施したところ、試験期間中の炭酸ガス添加区の最高細胞密度は対照区の約 1.5 倍となり、炭酸ガス添加の効果が認められた。しかし、細胞密度が最高に到達した後、急激な減少がみられる場合もあったことから、効果の安定性に欠けることが指摘された。また、同事業場<sup>9)</sup>では、1986 年にナンノクロロプシス培養水中の全炭酸量を低水温期（平均水温 9.4°C）と高水温期（平均水温 28.1°C）に測定したところ、低水温期には、高い値を維持し、ナンノクロロプシスも培養 7 日目でまだ増殖傾向を示していた。これに対し、高水温期には、培養 3~4 日目にはすでに低水温期より低い細胞密度で定常期に達し、その時の全炭酸量はほとんど 0 mm を示していた。このことから、高水温期には、培養水中の炭素源の不足がナンノクロロプシスの増殖の制限要因の一つであり、炭酸ガスの添加は有効な培養手法になり得ることが示唆された。

以上のように、ナンノクロロプシス培養において炭素源補給としての炭酸ガスの添加は有効な培養手法になり得ると考えられるが、これまでの報告においては、安定した効果が期待できるメカニズムについては必ずしも明らかにされていなかった。

そこで、本研究では、ナンノクロロプシス培養における炭酸ガスの添加の効果をより明確に把握するために、高水温期と低水温期に 0.5 m<sup>3</sup> 水槽を用いて炭酸ガス添加による培養試験を実施した。また、高水温期には大型水槽（実水量 10~20 m<sup>3</sup>）を用いた培養試験も行った。さらに高水温期の 0.5 m<sup>3</sup> 水槽を用いた試験では、ナンノクロロプシスの増殖と培養水中の炭素源量との関係を把握するために培養水中の全炭酸量を測定した。それらの結果につ

\*1 日本栽培漁業協会玉野事業場（〒706 岡山県玉野市築港 5-21-1）

\*2 良永知義，昭和 58 年度玉野事業場報告（謄写版）：37-48 pp.

\*3 福永恭平，昭和 59 年度玉野事業場報告（謄写版）：22-26 pp.

いてここに報告する。なお、ここでは高水温期と低水温期を便宜上水温およそ 24°C (10 時の測定値) で区分した。

## 材料および方法

**高水温期における炭酸ガス添加試験** 試験は 2 回行った。第 1 回試験の試験区は、炭酸ガスを添加しない区 (対照区)、8 m<sup>\*1</sup> の CO<sub>2</sub> パームを用いて炭酸ガスを添加する区 (CO<sub>2</sub> パーム区) および円柱形のエアーストン (直径 3 cm、長さ 5 cm) 1 個を用いて 2 l/分 で炭酸ガスを添加する区 (エアーストン区) の合計 3 区であり、試験期間は 1987 年 9 月 1 日から 7 日までの 6 日間である。

第 2 回試験の試験区は、炭酸ガス無添加の区 (対照区) およびエアーストンを用いて 0.5 l/分、1 l/分、2 l/分 で炭酸ガスを添加する区 (それぞれ 0.5 l 区、1 l 区、2 l 区) の合計 4 区であり、試験期間は 1987 年 9 月 8 日から 13 日までの 5 日間である。

培養には、屋外に設置した 0.5 m<sup>3</sup> パンライト水槽を各区 1 面使用し、玉野事業場の屋外大型コンクリート水槽 (7.6×7.4×1.0 m、容量 50 m<sup>3</sup>) で大量培養していたナンノクロプシスを用いた。各区とも試験開始時に肥料として、単位水量 (m<sup>3</sup>) 当り硫酸: 50 g、過リン酸石灰: 7.5 g、尿素: 5 g、クレワット 32 (帝国化学産業): 2 g を添加した。培養に用いる海水は砂ろ過海水とし、塩分は培養開始時に 75‰ 海水になるよう水道水で調節した。すべての区でエアーストンを用いて強い通気を施した。

炭酸ガスの添加は、炭酸ガスポンプ (市販の液化炭酸ガス 30 kg) に取り付けした炭酸ガス調節器 (YAMATO CO<sub>2</sub> REGULATOR TR-509 ヤマト産業) を用いて試験開始日の 14 時から行った。炭酸ガス調節器と添加器具 (CO<sub>2</sub> パーム、エアーストン) の間には電磁弁を組み込み、タイマーによって炭酸ガスの添加時間を 6 時~18 時までの 12 時間に設定した。なお、CO<sub>2</sub> パーム区では炭酸ガス調節器の圧力を 0.6 kg/cm<sup>2</sup> に調節し、エアーストン区では設定流量が保持されるよう適宜調節した。

試験期間中は、毎日 10 時にトーマの血球計算盤を用いて細胞密度 (細胞数/ml) を計数し、水温 (棒状水銀水温計)、pH (ガラス電極 pH 計、TOA pH METER HM-30S) および全炭酸量を測定した。全炭酸量の測定は板沢<sup>9),\*2</sup>を参考にし、拡散分析法で行った。なお、水温は各区で大差がなかったため、代表として対照区の値を用いた。

**低水温期における炭酸ガス添加試験** 試験区として、炭酸ガス無添加の区 (対照区) および培養水中の pH が 7, 6.5, 6 になるように炭酸ガスを添加する区 (それぞれ pH 7 区、pH 6.5 区、pH 6 区) の合計 4 区を設けた。試験は、1990 年 4 月 18 日から 27 日までの 9 日間 (第 1 回試験) と 6 月 6 日から 14 日までの 8 日間 (第 2 回試験) の 2 回行った。試験方法・測定項目は、上述の高水温期における試験と同様とした。なお、本試験では培養水の塩分の調節および全炭酸量の測定は行わなかった。pH は 1 日に 2 回測定し、各炭酸ガス添加区の設定 pH になるよう炭酸ガスの添加量を調節した。なお、水温は各区で大差がなかったため、代表として対照区の値を用いた。pH は、2 回の測定値の平均値を用いた。

**高水温期における大型水槽を用いた炭酸ガス添加試験** 試験は 1989 年 8 月 19 日から 9 月 2 日の間に 3 回行い、いずれも前述した玉野事業場の大型コンクリート水槽を用いた。第 1 回および第 2 回試験は水量 20 m<sup>3</sup> (水深、約 40 cm)、第 3 回試験は水量 10 m<sup>3</sup> (水深、約 20 cm) で培養を行った。炭酸ガスの添加器具として 1 水槽当り酸素流量制御装置 (六連式: 古橋製作所) 1 基と酸素分散器 6 本 (長さ 20 cm: 古橋製作所) を用い、流量制御装置の圧力を 0.5~0.7 kg/cm<sup>2</sup>、流量を最大の 10 l/分に設定した。炭酸ガスの添加は、試験開始日の 6 時から開始した。各試験区とも炭酸ガスを添加しない対照区を設けた。炭酸ガス添加区および対照区ともエアブロックによる通気 (約 2000 l/分) を行った。培養方法・測定項目は、上述の低水温期における試験と同様とした。なお、水温は各区で大差がなかったため、代表として対照区の値を用いた。

## 結 果

### 高水温期における炭酸ガス添加試験

**第 1 回試験** 第 1 回試験の各区の細胞密度、水温、pH および全炭酸量の推移を図 1 に示した。各区とも 520 万

\*1 良永知義, 昭和 58 年度玉野事業場報告 (謄写版): 37-48 pp.

\*2 板沢靖男, 魚類生理実験の手引 (1), 九州大学農学部水産学第一教室 (謄写版): 10-11 pp.

細胞/ml で培養を開始した。対照区では、培養開始後2日目にはすでに約 1800 万細胞/ml で定常期に達し、5 日目には細胞のフロック化が起り、30 万細胞/ml まで急激に減少した。CO<sub>2</sub> パーム区では、2 日目までは対照区とほぼ同様の増殖傾向であったが、3 日目には 2750 万細胞/ml に達して対照区の約 1.5 倍まで増殖した。しかし、4 日目には細胞のフロック化が起り、細胞密度は 0 細胞/ml まで急激に減少した。エアーストン区では、3 日目以降活発な増殖がみられ、6 日目には 5270 万細胞/ml まで増殖し、対照区の最高の細胞密度の約 3 倍まで増殖した。

第1回試験の期間中の水温は、25.3~28.3°C の範囲にあった。pH は、対照区では4日目までは 8.7 前後であったが、細胞密度の低下がみられた5日目には 7.1 まで低下した。CO<sub>2</sub> パーム区では、3 日目までおよそ 8.0~8.4 の

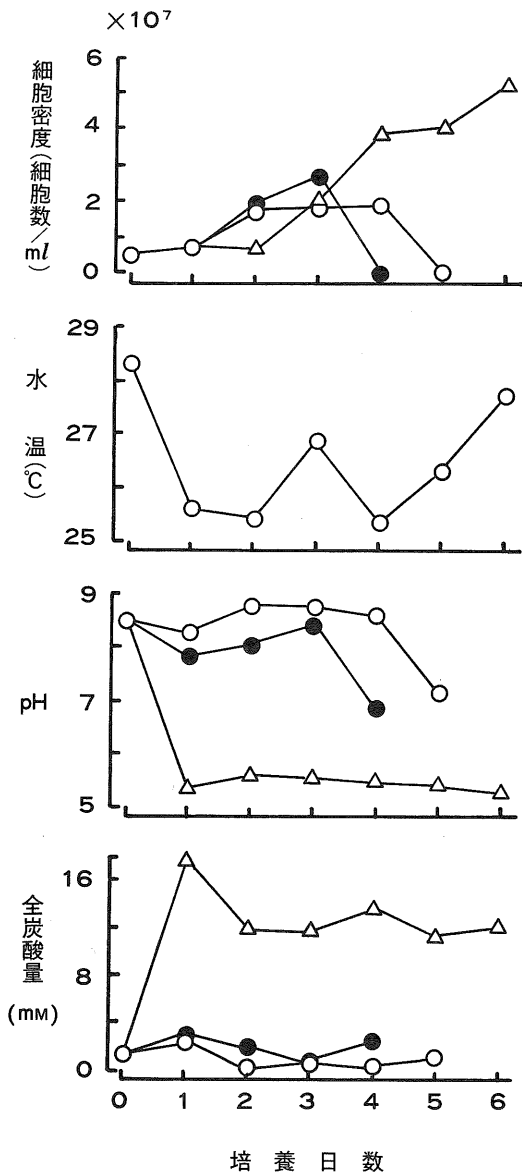


図1 高水温期、第1回炭酸ガス添加試験におけるナンノクロロプシス細胞密度、水温、pH および全炭酸量の推移

水温は各区で大差がなかった所以对照区の値のみを示した。○: 対照区, ●: CO<sub>2</sub> パーム区, △: エアーストン区

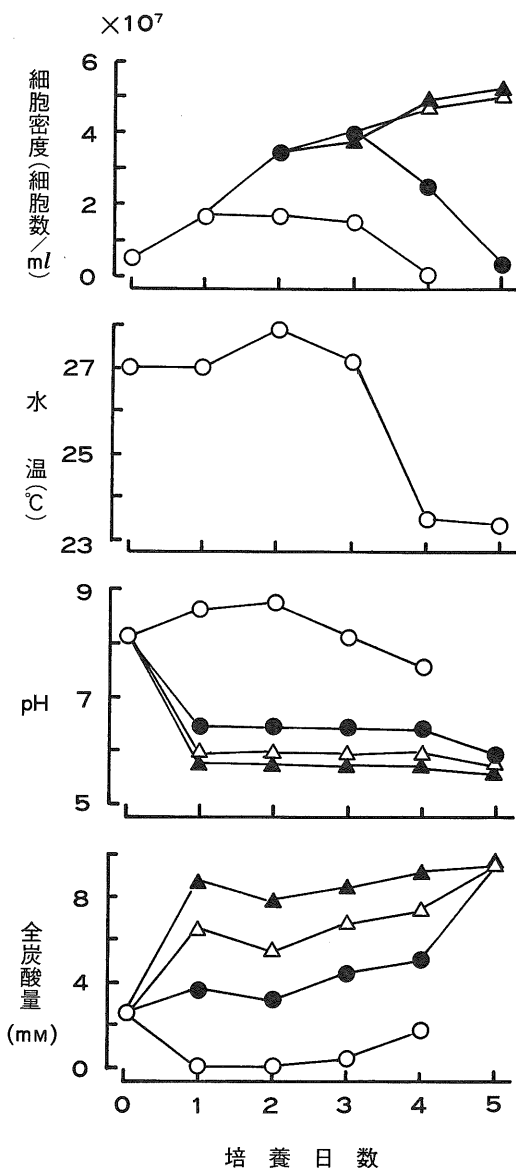


図2 高水温期、第2回炭酸ガス添加試験におけるナンノクロロプシス細胞密度、水温、pH および全炭酸量の推移

水温は各区で大差がなかった所以对照区の値のみを示した。○: 対照区, ●: 0.5 l 区, △: 1 l 区, ▲: 2 l 区

範囲にあったが、細胞密度の低下がみられた4日目には6.9まで低下した。エアーストン区では、期間中5.5前後で安定していた。全炭酸量は、培養開始時には1.36 mmであった。対照区では、細胞密度が定常期に達した2日目~4日目にかけてはほぼ0 mmを示していたが、細胞密度の低下がみられた5日目には1.29 mmに上昇した。CO<sub>2</sub> パーム区では、全炭酸量は培養開始後1日目には3.00 mmを示したが、その後細胞密度の増加に伴って減少し、3日目には0.70 mmとなった。そして、細胞密度の低下がみられた4日目には2.52 mmを示した。エアーストン区では、1日目に17.79 mmと高い値を示したが、その後12 mm前後の安定した高い値を示していた。各区のpHの変動と全炭酸量の変動は逆の傾向を示し、pHが低いほど全炭酸量は高い値を示した。

**第2回試験** 第2回試験の各区の細胞密度、水温、pHおよび全炭酸量の推移を図2に示した。各区とも500万細胞/mlで培養を開始した。各区とも培養1日目には1700万細胞/mlに達した。対照区では2日目以降の増殖はみられず、4日目には細胞のフロック化が起り、細胞密度が急激に減少した。一方、炭酸ガスを添加した3試験区では、3日目まではほぼ同様の増殖がみられ、3区とも約3800万細胞/mlに達した。しかし、0.5 l区では、4日目に細胞密度の減少がみられ、5日目に細胞のフロック化が起り、細胞密度は260万細胞/mlまで急激に減少した。1 l区および2 l区では、3日目以降も増殖がみられ、5日目には1 l区の細胞密度は4940万細胞/ml、2 l区は5210万細胞/mlとなり、両区とも対照区の最高の細胞密度の約3倍まで到達した。

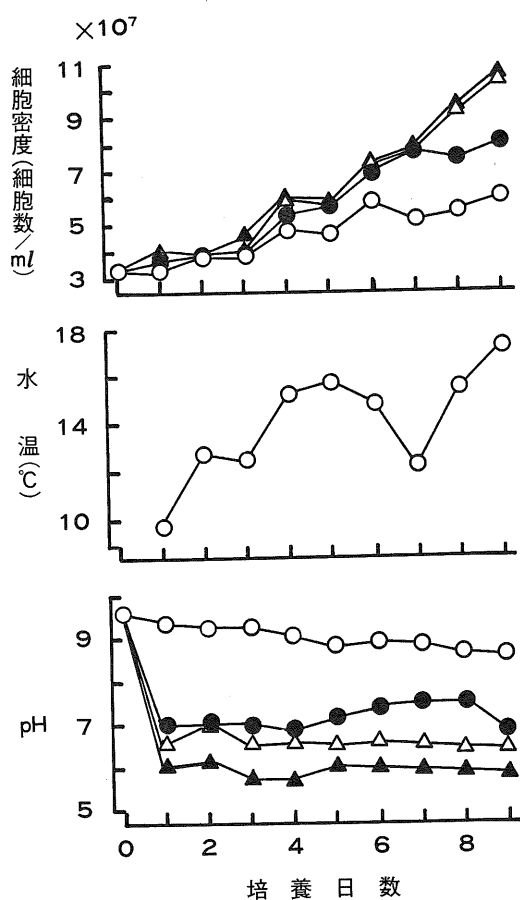


図3 低水温期、第1回炭酸ガス添加試験におけるナンノクロロプシス細胞密度、水温およびpHの推移  
水温は各区で大差がなかったので対照区の値のみを示した。○: 対照区, ●: pH 7 区, △: pH 6.5 区, ▲: pH 6 区

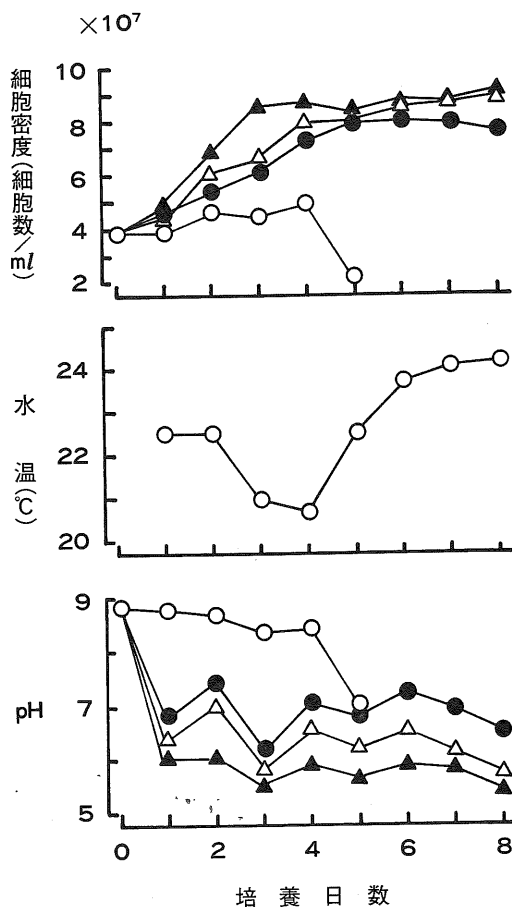


図4 低水温期、第2回炭酸ガス添加試験におけるナンノクロロプシス細胞密度、水温およびpHの推移  
水温は各区で大差がなかったので対照区の値のみを示した。○: 対照区, ●: pH 7 区, △: pH 6.5 区, ▲: pH 6 区

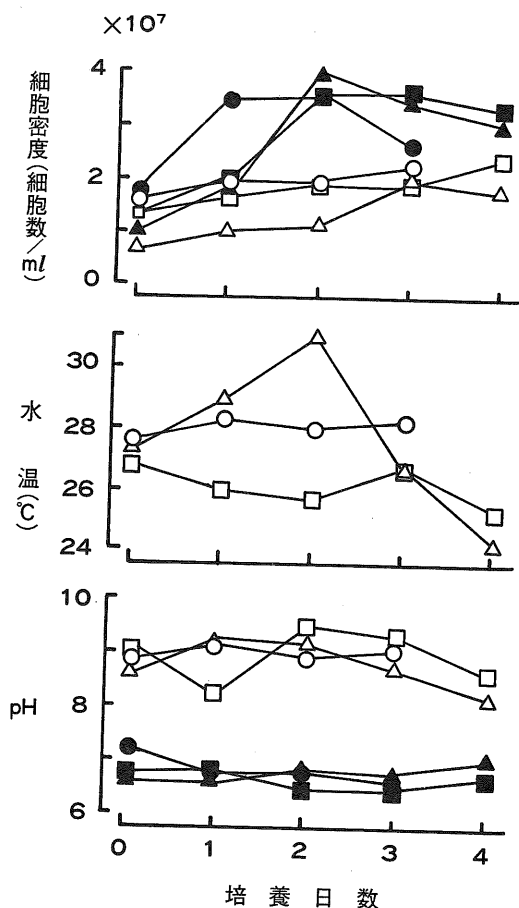


図5 高水温期、大型水槽を用いた炭酸ガス添加試験におけるナンノクロプシス細胞密度、水温および pH の推移

水温は各区で差がなかったので対照区の値のみを示した。○, ●: 第1回試験, △, ▲: 第2回試験, □, ■: 第3回試験, 白抜きは対照区, 中黒は添加区

第2回試験の期間中の水温は、23.3~28.1°Cの範囲にあった。pHは、対照区では3日目までは8.0を越えていたが、細胞密度の低下がみられた4日目には、7.6に低下した。炭酸ガスを添加した区では、炭酸ガスの添加量が多いほどpHは低い値を示し、添加量の多い順におよそ6.5, 6.0, 5.7前後で安定していた。全炭酸量は、培養開始時には2.56mmであった。対照区では、細胞密度が定常期に達した培養開始後1~3日目にはほぼ0mmを示しており、細胞密度の低下がみられた4日目に1.82mmになった。炭酸ガスを添加した区では、炭酸ガスの添加量が多いほど全炭酸量は多く、0.5l区では細胞密度の低下がみられた5日目を除くとおよそ4~5mm, 1l区では試験期間中6~10mm, 2l区では同じく8~10mmであった。全炭酸量およびその変動は、pHと逆の傾向を示していた。

#### 低水温期における炭酸ガス添加試験

**第1回試験** 第1回試験の各区の細胞密度、水温およびpHの推移を図3に示した。各区とも3300万細胞/mlで培養を開始した。各区とも培養2日目までは一様に増殖傾向にあったが、3日目以降は炭酸ガスを添加した区が対照区に比べ良好な増殖傾向を示した。対照区は6日目以降5500万細胞/ml前後で、pH7区は7日目以降7500万細胞/ml前後で定常期に達した。これに対しpH6.5区とpH6区ではその後も増殖を続け、9日目にはおよそ1億細胞/mlに達した。試験期間中のpH7区、pH6.5区およびpH6区の最高の細胞密度は、対照区のそれぞれ1.3倍、1.7倍および1.8倍であった。

第1回試験の期間中の水温は、9.8~17.2°Cの範囲にあった。1日に2回測定したpHの平均値は、対照区ではおよそ9.0前後で推移したが、炭酸ガスを添加した区では、ほぼ設定通りに推移していた。

**第2回試験** 第2回試験の各区の細胞密度、水温およびpHの推移を図4に示した。各区とも3800万細胞/mlで培養を開始した。対照区では、細胞密度は、徐々に増加して培養開始後4日目には4840万細胞/mlに達した。しかし、5日目に細胞のフロック化が起こり、細胞密度が急激に低下し2150万細胞/mlとなった。炭酸ガスを添加した区では、pHが低いほど細胞の増殖が良く、培養開始後3~5日目にはpH7区はおよそ7500万細胞/ml, pH6.5区とpH6区ではおよそ9000万細胞/mlに達して以後定常状態となった。試験期間中のpH7区、pH6.5区およびpH6区の最高の細胞密度は、対照区のそれぞれ1.7倍、1.8倍および1.9倍であった。

第2回試験の期間中の水温は、22.5~24.1°Cの範囲にあった。1日に2回測定したpHの平均値は、対照区では8.0~9.0の範囲で推移したが、細胞密度の低下がみられた5日目に、7.0まで低下した。炭酸ガスを添加した区では、若干の変動があるもののほぼ設定通りに推移した。

**高水温期における大型水槽を用いた炭酸ガス添加試験** 試験期間中の細胞密度、水温およびpHの推移を図5に示した。水量20m<sup>3</sup>で培養を行った第1回および第2回試験の炭酸ガス添加区の細胞密度は、培養開始後1~2日目に最高に達し、およそ3500万~4000万細胞/mlを示した。対照区の最高の細胞密度はおよそ2000万~2200万細胞/mlであり、添加区の密度の方が1.6~2倍高かった。しかし、添加区では最高の細胞密度に到達後、翌日には

細胞のフロック化が起こり、細胞密度が低下した。第1回および第2回試験の期間中の水温は  $24.2\sim 31^{\circ}\text{C}$ 、pH は対照区が  $8.1\sim 9.1$ 、添加区が  $6.6\sim 7.3$  の範囲にあった。

水量  $10\text{ m}^3$  で培養を行った第3回試験の炭酸ガス添加区の細胞密度は、培養開始後2日目に  $3600$  万細胞/ml に達した。その後、細胞密度の増加はみられなかったが、第1回、第2回試験のような細胞密度の大きな低下はみられなかった。対照区の最高の細胞密度は、 $2400$  万細胞/ml であり、添加区の密度が  $1.5$  倍高かった。第3回試験期間中の水温は  $25.3\sim 26.8^{\circ}\text{C}$ 、pH は対照区が  $8.2\sim 9.5$ 、添加区が  $6.5\sim 6.8$  の範囲にあった。

## 考 察

高水温期における炭酸ガス添加試験において、培養水中の全炭酸量を測定したところ、細胞の増殖傾向と全炭酸量の間には一定の関係がみられ、いわゆる落ち現象がみられた区では、その前に炭酸をほとんど  $0\text{ mm}$  になるまで消費していた。

松江・平野<sup>10)</sup>は、淡水産緑藻 *Scenedesmus* を用いた実験において、今回の試験結果と同様のことを報告している。すなわち、*Scenedesmus* は炭酸をほとんど  $0\text{ mm}$  になるまで消費し、浮遊性を失って沈澱してしまうことから、水中の炭酸の不足が植物プランクトンの繁殖の制限要因となることが充分想像されると述べている。

以上のことから、松江・平野の指摘と同様に、全炭酸量の不足はナンノクロロプシスの増殖の停滞あるいは落ち現象と関連していると思われ、炭素源の補給がないかあるいは少ない培養条件の場合には、細胞の増殖は制限されることが考えられる。よって、そのような場合には、何等かの炭素源の補給が必要と考えられ、今回の試験のように高水温期における炭酸ガスの添加は本種の有効な培養手法になり得ると考えられる。

海水中の炭酸物質の存在形態は pH により大きく左右され、酸性側で遊離炭酸、中性付近で重炭酸、アルカリ性側で炭酸が多く存在する<sup>11)</sup>。

海産の植物プランクトンは光合成の炭素源として遊離炭酸を利用するのが一般的で、重炭酸イオンを直接光合成に利用できる藻類もあるようだが、すべての藻類で利用されるか確かではないと言われている<sup>12)</sup>。ただ、海水の pH 値は高く (約  $8.2$ )、溶存炭酸物質はほとんど重炭酸であることから、細胞内で重炭酸イオンから二酸化炭素への脱水反応を触媒する酵素 (カルボニックアンヒドラーゼ) の役割が大きであろうことが推測されている<sup>13)</sup>。ナンノクロロプシス培養において通常の pH は  $8\sim 10$  であることから、ナンノクロロプシスも重炭酸イオンを間接的に利用しているものと推測されるが、本試験において炭酸ガス添加によって pH が弱酸性に保持された区で細胞の増殖が良好であったことから推して、ナンノクロロプシスは重炭酸イオンよりも遊離炭酸を主に利用しているものと思われる。

高水温期における炭酸ガス添加試験において落ち現象がみられなかった区は、第1回試験のエーストン区と第2回試験の  $1\text{ l}$  区および  $2\text{ l}$  区であった。これらの区はいずれも培養水中の全炭酸量が多く、pH が  $6$  以下を示した区であった。これらの区の細胞の増殖が良好であったのは、前述のようにナンノクロロプシスは遊離炭酸を主に利用していると考えられることから、炭酸ガス添加による全炭酸量の増加と、pH の低下に伴う利用し易い遊離炭酸量の増加 (pH  $6$  では全炭酸量の約  $50\%$ <sup>11)</sup>) とが相乗的に働いた結果と推測される。なお、第2回試験の  $0.5\text{ l}$  区 (pH  $6.5$ ) で、対照区より良好な増殖を示したにもかかわらず落ち現象がみられたのは、炭酸ガス添加によって細胞密度が上昇し、培養水全体の炭酸要求量が高まって炭素源不足が生じたためであると考えられる。

以上のように、ナンノクロロプシス培養における培養水中の全炭酸量と pH は培養成績を決定する重要な要素である。かつ、各区の培養水の pH と全炭酸量は逆の関係を示していたことから、pH を目安にした炭酸ガスの添加量の調節が可能であると考えられる。今回の試験の設定条件のもとでは、高水温期 (およそ  $24^{\circ}\text{C}\leq$ ) には pH  $6$  を目安にした炭酸ガスの添加が有効であると思われる。その場合、図 1, 2 にあるように対照区が定常期に達するまでは、添加区と対照区の増殖傾向に差がないことから、定常期に達して以降に添加を開始するのがより効率的であると考えられる。

低水温期における炭酸ガス添加試験では、pH が  $7, 6.5, 6$  になるよう添加量を調節したが、第1回および第2回試験とも炭酸ガス添加区は対照区よりも良好な増殖を示し、特に pH  $6.5$  あるいは pH  $6$  区では対照区の最高の細胞密度の約  $2$  倍程度に増殖した。炭酸ガス添加区で増殖が良好であったのは、高水温期の試験と同様に、全炭酸量の増加と pH の低下による遊離炭酸量の増加によるものと考えられる。このように、低水温期 (およそ  $24^{\circ}\text{C}>$ ) にも炭酸ガスの添加は有効であると考えられ、今回の試験の設定条件のもとでは、pH  $6.5$  を目安とした炭酸ガスの添

加が効果的であると考えられる。

高水温期における添加試験では、培養水の pH がほぼ 6.5 で推移した 0.5 l 区において、対照区より増殖は良好であったにもかかわらず落ち現象がみられた。一方、低水温期の pH 6.5 区では落ち現象はみられなかった。前述の海水中の炭酸物質の存在様式は、pH の他に水温や塩分にも影響されることが知られており、水温が低いと遊離炭酸の存在割合が増加する<sup>14)</sup>。従って、高水温期と低水温期における pH 6.5 での増殖状態の差は、水温による遊離炭酸の存在割合の相違、加えて細胞の代謝速度の違いによる炭酸要求量の違いとして説明できると思われる。

高水温期における大型水槽を用いた炭酸ガス添加試験では、炭酸ガス添加区の最高の細胞密度は対照区のその約 1.5~2 倍であり、炭酸ガス添加の効果がみられたものの、炭酸ガス添加区では水量 10 m<sup>3</sup> で行った第 3 回試験を除いて落ち現象がみられた。添加区の pH は 6.5~7.3 の範囲にあり、高水温期の 0.5 m<sup>3</sup> 水槽を用いた第 2 回試験区の 0.5 l 区 (pH 6.5) と同じ様な経過を示した。このように大型水槽では、今回の試験の設定条件のもとでは若干の効果がみられたに過ぎなかった。しかし、大型水槽は表面積が広い割には水深が浅く、培養水が全体に混合しにくいこと等小型水槽に比べたマイナス面があり、それらを差し引いて考えると、大型水槽の結果は小型水槽の結果と相似していると考えられる。従って、今後、効率の良い炭酸ガスの添加手法の検討によって大型水槽でもより顕著な炭酸ガスの添加効果が期待できると思われる。なお、著者らが予備的に高水温期に中型水槽 (円型水槽、直径 4 m、高さ 0.8 m、水量 10 m<sup>3</sup>) を用いて行った試験では、pH を 6 に維持することができ、3500 万細胞/ml 以上まで増殖したことから、炭酸ガスの添加は、当面は培養の不安定な高水温期における“たね (種)”の維持培養に利用可能であると思われる。

以上のように、ナンノクロロプシス培養における炭酸ガスの添加は有効であると考えられ、今回設定した条件のもとでは、pH が 6~6.5 になるように炭酸ガスを添加することが効果的であると考えられた。これをもとに判断すると、まえがきで述べた日本栽培漁業協会上浦事業場において炭酸ガスの添加効果が不明確であるのは、量産過程における培養試験であり、種々の培養条件の影響が大きいためと考えられるが、炭酸ガスの添加不足による pH の低下不足も一つの要因であると思われる。また、広島県水産試験場では炭酸ガスの添加効果が認められているが、その時の炭酸ガス添加区の最高の細胞密度は約 2600 万細胞/ml 程度であり、もし、それ以降も培養を継続し、それ以上の高密度にまで増殖した場合には、今回の炭酸ガスの添加量が少なかった区と同様に落ち現象が起きた可能性があったものと思われる。

今回の試験結果では、pH が 6.5~6 になるような炭酸ガスの添加が効果的であると考えられたが、日本栽培漁業協会若狭湾小浜事業場<sup>15)</sup>は、炭酸ガスを過剰に添加して pH を 5 台まで低下させた場合に光合成速度が大幅に低下することから、炭酸ガスの適正な添加量は pH 7.0~7.5 を目安にした量であると報告している。また、MARUYAMA<sup>11)</sup>は、ナンノクロロプシスの増殖率に及ぼす培養開始時の pH の影響を水温 25°C の条件で調べた結果、pH 8 程度が適しており、pH 6 程度ではほとんど増殖しないことを報告している。一方、先述の小浜事業場の実験では、塩酸を添加して pH 5 台まで低下させた場合には、光合成速度の増加がみられたと報告している。このように、ナンノクロロプシスの培養あるいは光合成に適した培養水の pH の機能については、依然として不明確な点がある。しかも、先に述べたようにナンノクロロプシスの培養において pH は重要な要素であることから、この点は今後に解決すべき課題である。

以上の考察をまとめてみると、今回の試験結果から、ナンノクロロプシスの培養において、炭素源の不足が増殖の制限要因の一つと考えられ、何等かの炭素源の補給が必要であること、また、pH は水中の炭酸物質の存在様式を規定する重要な要素であり、ナンノクロロプシスの増殖に影響を及ぼすと考えられることの二点が明らかとなった。生産現場においてはナンノクロロプシスの増殖に影響を与える種々の培養条件を設定する必要があるが、今回の試験で設定された培養条件のもとでは、高水温期 (およそ 24°C ≤) には pH 6 程度の維持、低水温期 (およそ 24°C >) には pH 6.5 程度の維持を目安にした炭酸ガスの添加を行うことによって、ナンノクロロプシスの高密度・安定培養が可能であると考えられる。しかし、現在のナンノクロロプシスの培養は開放系の培養であることから、炭酸ガスの添加効率は非常に悪いと考えられる。従って、今後は水槽の構造を含めた炭酸ガスの添加手法について検討し、より実用に資するために大型水槽を用いて添加効果を上げる必要があろう。また、先述のようにナンノクロロプシス培養における pH の機能については依然不明確な点があるものの、予め酸性物質を用いて培養水の pH を 6~6.5 に低下させて炭酸ガスを添加すれば、より有効に炭酸ガスを利用できる可能性がある。今後は、この点についての検討も必要であらう。



## 謝 辞

本研究を進めるにあたり、有益な助言を頂いた日本栽培漁業協会古澤 徹第一技術部長ならびに石橋矩久前玉野事業場場長（現八重山事業場場長）に深謝する。ナンノクロロプシスの培養に御協力頂いた玉野事業場の職員各位に感謝の意を表する。

## 文 献

- 1) MARUYAMA, I., T. NAKAMURA, T. MATSUBAYASI, Y. ANDO and T. MAEDA (1986) Identification of the alga known as "marine *Chlorella*" as a member of the Eustigmatophyceae. *Jap. J. Phycol. (Sorui)*, 34: 319-325.
- 2) 千原光雄・横浜康継・原 慶明 (1986) 初期餌料としての海産クロレラ及び近縁種の分類に関する研究。昭和 61 年度農林水産特別試験研究費補助による研究報告書: 1-17 pp.
- 3) ——— (1987) 初期餌料としての海産クロレラ及び近縁種の分類に関する研究。昭和 62 年度農林水産特別試験研究費補助による研究報告書: 1-10 pp.
- 4) 平田郁夫 (1989) 初期餌料生物—シオミズツボウムシ, II. 大量培養法, 2. 餌料の種類と給餌法。恒星社厚生閣, 東京: 73-74 pp.
- 5) 岡内正典 (1989) 初期餌料生物—シオミズツボウムシ, II. 大量培養法, 3. 餌料用微小藻類の大量培養。恒星社厚生閣, 東京: 93-106 pp.
- 6) 日本栽培漁業協会 (1987) 日本栽培漁業協会事業年報昭和 61 年度, III-2. 餌料生物の培養と飼餌料の開発, A. クロレラ: 108-111 pp.
- 7) 広島県水産試験場 (1985) 昭和 58 年度特定研究開発促進事業, 初期餌料の培養技術開発研究報告書: 1-2 pp.
- 8) 日本栽培漁業協会 (1984) 日本栽培漁業協会事業年報昭和 58 年度, III 種苗生産技術開発の概要, 2. 餌料生物の培養と飼餌料の開発, A. クロレラ: 61-62 pp.
- 9) 板沢靖男 (1963) 養鰻池水炭酸量の日中変化。日水誌, 29: 226-234.
- 10) 松江吉行・平野礼次郎 (1955) 水中の総炭酸量と植物プランクトン繁殖との関係について。陸水学雑誌, 17, 133-140.
- 11) 室月欣二 (1974) 水界生態系—概論。共立出版, 東京: 22 pp.
- 12) 有賀祐勝 (1973) 水界植物群落の物質生産 II—植物プランクトン。共立出版, 東京: 52 pp.
- 13) 神谷明男 (1980) 藻類の光合成と環境要因。光合成と物質生産。理工学社, 東京: 317-322 pp.
- 14) 小久保清治 (1962) 海洋生物学。恒星社厚生閣, 東京: 173-176 pp.
- 15) 日本栽培漁業協会 (1985) 日本栽培漁業協会事業年報昭和 59 年度, III-2. 餌料生物の培養と飼餌料の開発, A. クロレラ: 82-85 pp.