

ケイ酸供給剤添加による *Chaetoceros neogracile* の培養 (栽培漁業センター生産事業)

渡辺利明*, 山本隆司*, 岩井憲司

沖縄県栽培漁業センター (以下, 栽培セ) では, シラヒゲウニの幼生飼育時の主餌料として *Chaetoceros neogracile* を用いている。これまで, *C. neogracile* の培養には, ケイ酸源としてメタケイ酸ナトリウム ($\text{Na}_2\text{SiO}_2 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$) を使用しているが, 沈殿が生じたり, 増殖不良が発生したりすることがあった。そこで, ケイ酸供給剤としてゲルカルチャー (富士シリシア科学株式会社) を用いて, 安定的な高密度培養ができないかを検討した。

材料及び方法

培養試験には, 栽培セで継代培養している *C. neogracile* 株を使用した。培養液は, 90%精密濾過海水に藻類培養液 KW21 (第一製網株式会社) を添加し, ケイ酸源としてゲルカルチャー (ゲル区) またはメタケイ酸ナトリウム (メタ区) を用いた。培養開始時の *C. neogracile* の密度は 50 万 cells/mL 程度とした。照明には白色蛍光灯を用い, 培養時の照度は 1,300~1,600lx であった。培養室は, 25°C に設定し, 培養水温は 24.0~25.6°C であった。通気はエアープンプ (コーシンプロア AK60, (株) 工進) により行った。なお, KW21 添加量, ケイ酸源添加量, 培養開始密度は, 石川・磯 (2012), 岡内・中村 (2008), 有限会社アイエスシー (ゲルカルチャー商品説明) を参考に設定した。各試験区の添加量は表 1 に示した。

また, 細胞数の計数は血球計算盤により行った。

(1) 試験 I

ゲルカルチャー添加 (ゲル区) とメタケイ酸ナトリウム添加 (メタ区) での *C. neogracile* の増殖を比較するため 3L 丸底フラスコで培養試験を実施した。ゲル区には, 0.5, 1, 2g/L のゲルカルチャーを, メタ区には 33, 67, 100mg/L のメタケイ酸ナトリウムを添加した。また全ての試験区に 0.67mL/L の KW21 を添加した。試験期間は 2018 年 10 月 15 日~11 月 21 日までの 37 日間であった。

(2) 試験 II

KW21 の添加量を増やしたときの増殖効果をみるため,

KW21 の添加量を 1mL/L に増やし, 試験 I と同様の試験を実施した。試験期間は 2018 年 10 月 24 日~11 月 28 日までの 35 日間であった。

(3) 試験 III

シラヒゲウニ幼生飼育時の餌料培養の主体となる 5L 丸底フラスコでの比較試験を実施した。ゲル区には, 0.6, 1.2, 2.4g/L のゲルカルチャーを, メタ区には 30, 60, 100mg/L のメタケイ酸ナトリウムを添加した。また全ての試験区に 1.0mL/L の KW21 を添加した。試験期間は 2018 年 10 月 29 日~11 月 28 日までの 30 日間であった。

(4) 試験 IV

メタケイ酸ナトリウム使用時の KW21 の添加量を検討するため, 5L 丸底フラスコを用いて試験を実施した。メタケイ酸ナトリウム添加量は 40mg/L で, KW21 が 0.67mL/L と 1mL/L の試験区を設けた。また, 対照区としてゲルカルチャー添加区 (ゲルカルチャー: 0.6g/L, KW21: 1mL/L) も設けた。試験期間は 2018 年 11 月 6 日~12 月 4 日までの 28 日間であった。

(5) 幼生飼育時の培養

メタケイ酸ナトリウム添加による培養は, 第 1 回幼生飼育 (2018 年 6 月 18 日~7 月 9 日) と第 2 回幼生飼育 (同年 8 月 29 日~9 月 26 日) のため同年 4 月 6 日~9 月 26 日まで実施した。メタケイ酸ナトリウムは 33~40mg/L, KW21 は 0.6~0.67mL/L を添加した。培養開始時には, 同時培養しているものから 200~400mL 接種した。接種密度は, 10.0~39.3 (平均 23.4) 万 cells/mL であった。

ゲルカルチャー添加による培養は, 第 3 回幼生飼育 (2018 年 11 月 19 日~12 月 27 日) のため同年 10 月 31 日~12 月 27 日まで実施した。ゲルカルチャーは 0.6~1.0g/L, KW21 は 1mL/L を添加した。培養開始時には, 同時培養しているものから 100~300mL 接種した。接種密度は, 21.4~65.0 (平均 44.3) 万 cells/mL であった。

細胞密度を計数したフラスコ総数は, メタケイ酸ナトリウム添加時, 5L フラスコが 104 本, 3L フラスコが 22 本で,

*: 退職

ゲルカルチャー添加時、5L フラスコが 84 本、3L フラスコが 45 本であった。

結果

(1) 試験 I

培養 3 日目の細胞密度は、ゲル区が 248~319 万 cells/mL、メタ区が 201~314 万 cells/mL と両区に大きな違いは見られなかった。それ以降ゲル区は、14 日目に 797~854 万 cells/mL と増殖したのに対し、メタ区は、A、B 区が 14 日目で 715~747 万 cells/mL とゲル区よりやや低い程度であったが、メタケイ酸添加量が最も多い C 区の増殖が停滞し 14 日目でも 337 万 cells/mL であった。21~30 日目には、ゲル区はどの試験区もほぼ 900 万 cells/mL 以上を維持したが、メタ区では、A、B 区が 600~800 万 cells/mL で、C 区が 400 万 cells/mL 以下であった (図 1)。

(2) 試験 II

培養 8 日目の細胞密度は、ゲル区が 678~970 万 cells/mL、メタ区が 665~827 万 cells/mL と両区に大きな違いは見られなかった。それ以降ゲル区は、12 日目に 873~995 万 cells/mL に増殖したのに対し、メタ区は、B、C 区が 700~705 万 cells/mL とゲル区よりやや低い程度であったが、A 区が 588 万 cells/mL であった。20 日目には、ゲル区はどの試験区も 1,000 万 cells/mL 以上となったが、メタ区では、700~900 万 cells/mL であった (図 2)。

KW21 添加量が多い試験 II では、試験 I と比較し、ゲル区、メタ区とも初期の増殖速度が速く (8 日目: 試験 I が 345~694 万 cells/mL、試験 II が 665~970 万 cells/mL)、増殖のピークも高かった (試験 I : ゲル区が 993~1,170 万 cells/mL、メタ区が 465~854 万 cells/mL。試験 II : ゲル区が 1,030~1,395 万 cells/mL、メタ区が 727~930 万 cells/mL)。

(3) 試験 III

培養 9 日目の細胞密度は、ゲル区が 413~628 万 cells/mL、メタ区が 378~578 万 cells/mL と両区に大きな違いは見られなかった。それ以降ゲル区は、14 日目に 650~718 万 cells/mL に増殖したのに対し、メタ区は、B 区が 688 万 cells/mL とゲル区と同程度の増殖を示したものの A、C 区が 443~513 万 cells/mL であった。23 日目まで、ゲル区はどの試験区も 700 万 cells/mL 以上を維持したが、メタ区では、A、B 区が 600 万 cells/mL 台を維持したものの、C 区

が 400 万 cells/mL 以下となった (図 3)。

(4) 試験 IV

メタ A 区、B 区とも培養 8 日目には、それぞれ 573 万 cells/mL、553 万 cells/mL と初期の増殖速度に違いは見られなかった。ピーク時の細胞密度は、KW21 添加量が多い B 区が 725 万 cells/mL であったのに対し、A 区は 633 万 cells/mL であった。試験 I と試験 II で見られた KW21 添加量が多いと、増殖速度が速く、増殖ピークも高いという結果は得られなかった。

ゲル区とメタ区の比較をすると、培養 3 日目の細胞密度は、352~452 万 cells/mL と 3 試験区に大きな違いは見られなかった。それ以降ゲル区は、6 日目、668 万 cells/mL、20 日目、1,040 万 cells/mL に増殖したのに対し、メタ区は、6 日目、249~543 万 cells/mL、20 日目、558~725 万 cells/mL であった (図 4)。本試験のゲル区の最高細胞密度は、試験 III の同条件のゲル A 区と同程度となっている。

(5) 幼生飼育時の培養

メタケイ酸ナトリウム添加による培養では、5L フラスコでの平均細胞密度は 6 日目、171 万 cells/mL、11 日目、283 万 cells/mL と伸びたが、その後停滞し 28 日目は 301 万 cells/mL であった。3L フラスコでの平均細胞密度は 11 日目、285 万 cells/mL、19 日目、390 万 cells/mL と増加したが、26 日目は 401 万 cells/mL であった (図 5)。この培養での最高密度は、5L フラスコ培養 28 日目の 600 万 cells/mL であった。

ゲルカルチャー添加による培養では、5L フラスコでの平均細胞密度は 7 日目、391 万 cells/mL、14 日目、625 万 cells/mL、21 日目、771 万 cells/mL と伸びたが、その後減少に転じ 15 日目には 657 万 cells/mL となった。3L フラスコでの平均細胞密度は 7 日目、713 万 cells/mL、27 日目、964 万 cells/mL と増加したが、それ以降、停滞し 19 日目、1,038 万 cells/mL、22 日目、1,049 万 cells/mL と増殖のピークを迎えている (図 6)。この培養での最高密度は、3L フラスコ培養 21 日目の 1,603 万 cells/mL であった。

考察

(1) ゲルカルチャーの効果

試験 I では、ゲル区は 3 区全てが 900 万 cells/mL 以上になったのに対し、メタ区は 2 区が 600~800 万 cells/mL となったものの、1 区が 400 万 cells/mL 以下であった。試験

IIでは、ゲル区は3区全てが1,000万 cells/mL以上になったのに対し、メタ区は700~900万 cells/mLであった。試験IIIでは、培養3週間目、ゲル区は3区全てが700万 cells/mL以上になったのに対し、メタ区は2区が600万 cells/mL台になったものの、1区が400万 cells/mL以下であった。試験IVでは、培養3週間目にはゲル区は1,000万 cells/mL以上となったのに対し、メタ区は800万 cells/mL以下であった。

このように、4試験全てでゲル区は、メタ区より高い増殖を示した。また、ゲル区はメタ区と比較し、各試験区のはらつきが少なく、安定的に増殖した。以上の結果より、ケイ酸源としてゲルカルチャーを用いることにより、メタケイ酸ナトリウムを用いた場合より、高密度で安定的な *C. neogracile* の培養ができることがわかった。

また、シラヒゲウニ幼生飼育時の *C. neogracile* 培養では、メタケイ酸ナトリウム添加であった第1回・2回が5L フラスコでは300万 cells/mL程度、3L フラスコでは400万 cells/mL程度であったのに対し、試験結果を受けてゲルカルチャー添加に変更した第3回は、5L フラスコでは700万 cells/mL以上、3L フラスコでは1,000万 cells/mL以上となった。さらに、第1回・2回には、増殖不良で廃棄したものもあったが、第3回では、増殖不良のものは見られなかった。幼生飼育時の *C. neogracile* 培養は、時期、用いた元種、接種密度が異なるので、培養密度の直接比較はできないが、これまで見られなかった700~1,000cells/mL以上の増殖と培養の安定性から、従来の半分程度の培養量で済み、計画的培養ができる。今後の *C. neogracile* の培養では、ケイ酸源としてゲルカルチャーを使用した方がよいと考えられる。

なお、1回の幼生飼育で1m³水槽8面を使用する場合の *C. neogracile* 総給餌量は、400万 cells/mL換算で500L程度であり、この培養に要するメタケイ酸ナトリウムは20g、70円程度である。ゲルカルチャーを用いた場合は、細胞密度が2倍程度になるので、250Lの培養で250g、500円程度である。

(2) 今後の培養方法

今回の4回の試験でのゲルカルチャー添加量と *C. neogracile* の最高細胞密度の関係みると、試験I, IIでは0.5, 1, 2g/mLと添加量が増加するにつれ、細胞密度は993, 1,085, 1,170万 cells/mL(試験I), 1,030, 1,190, 1,395万 cells/mL(試験II)と増加したが、試験IIIでは0.6, 1.2, 2.4g/mLの添加量で、それぞれ975, 763, 783万 cells/mLと最も少ない添加量の区が最大値を示した。また、0.6g/Lの添加量で実施した試験IVでは、最高細胞密度は、1,040万 cells/mLであった(図7)。このように今回の試験でのゲルカルチャーの添加量、0.5~2g/Lの範囲では、添加量と *C. neogracile* の増殖に明瞭な相関は見られず、最も少ない0.5~0.6g/Lでも1,000万 cells/mL程度に増殖したので、今回の設定下限値の添加量でも有効と考えられる。

また、試験Iと試験IIでは、KW21添加量は、0.67mL/Lより1.0mL/Lに増やした方が、増殖速度が速く、ピークも高いという結果が得られたが、メタ区についてKW21添加量の相違を検討した試験IVでは、添加量による増殖効果は明瞭ではなかった。メタケイ酸ナトリウム添加では、増殖が安定しないという結果が試験I~IIIで得られているので、試験IVの結果は、メタケイ酸ナトリウム添加による培養の不安定さの影響とも解釈できる。

第3回幼生飼育時の *C. neogracile* 大量培養では、ゲルカルチャーが0.6~1.0g/L、KW21が1.0mL/Lの添加量で実施し、良好な結果が得られているので、今後の餌料培養では、この程度の添加量で実施できる。

文献

- 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(2), 51-55.
- 岡内正典, 中村耕二, 2008: 藻類用ケイ酸成分供給剤, および藻類へのケイ酸成分供給方法. 公開特許広報(A), 公開番号 特開2008-5835(P2008-5835A).
- 有限会社アイエスシー: 取扱商品説明, <http://www.isc1960.co.jp/gelculture.htm>

表1 試験区の設定

試験区		メタ A	メタ B	メタ C	ゲルA	ゲルB	ゲルC
試験 I 3Lフラスコ	ケイ酸源	33mg/L	67mg/L	100mg/L	0.5g/L	1g/L	2g/L
	KW21	0.67mL/L					
試験 II 3Lフラスコ	ケイ酸源	33mg/L	67mg/L	100mg/L	0.5g/L	1g/L	2g/L
	KW21	1.0mL/L					
試験 III 5Lフラスコ	ケイ酸源	30mg/L	60mg/L	100mg/L	0.6g/L	1.2g/L	2.4g/L
	KW21	1.0mL/L					
試験 IV 5Lフラスコ	ケイ酸源	40mg/L	40mg/L		0.6g/L		
	KW21	0.67mL/L	1.0mL/L		1.0mL/L		

メタ区:メタケイ酸ナトリウム添加区, ゲル区:ゲルカルチャー添加区

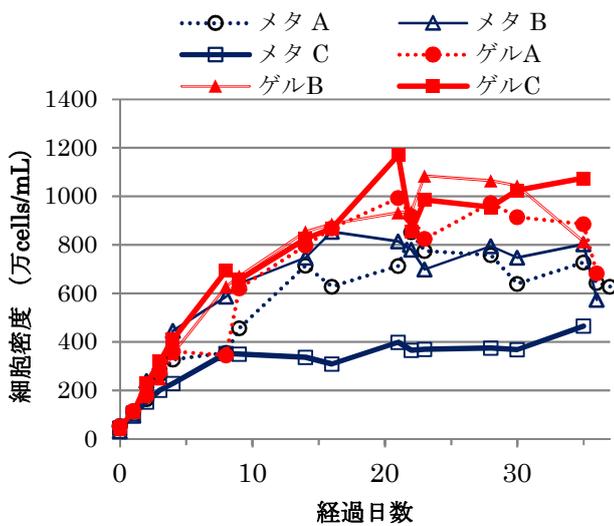


図1 ゲルカルチャー効果試験Iの結果

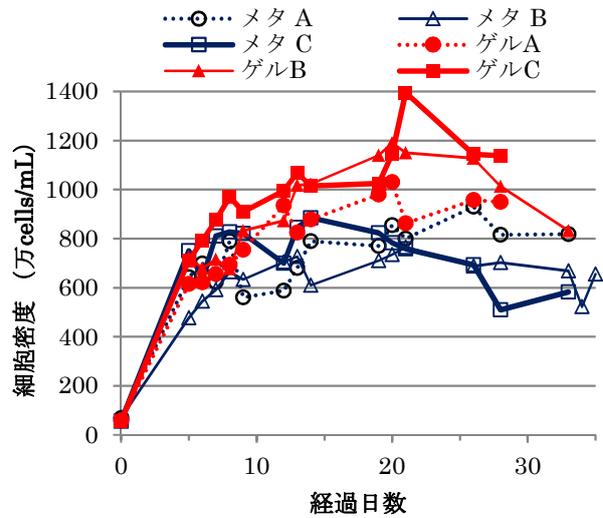


図2 ゲルカルチャー効果試験IIの結果

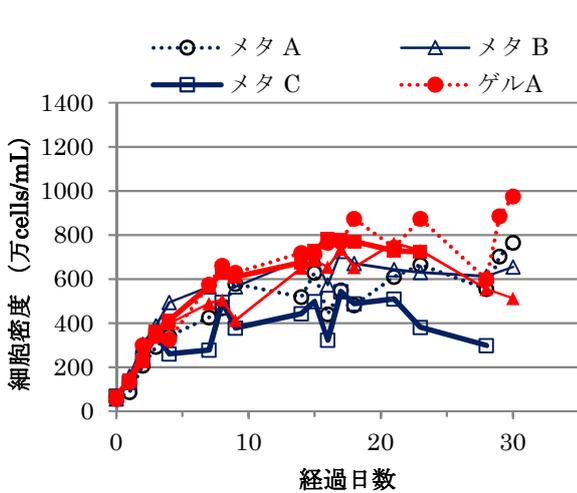


図3 ゲルカルチャー効果試験IIIの結果

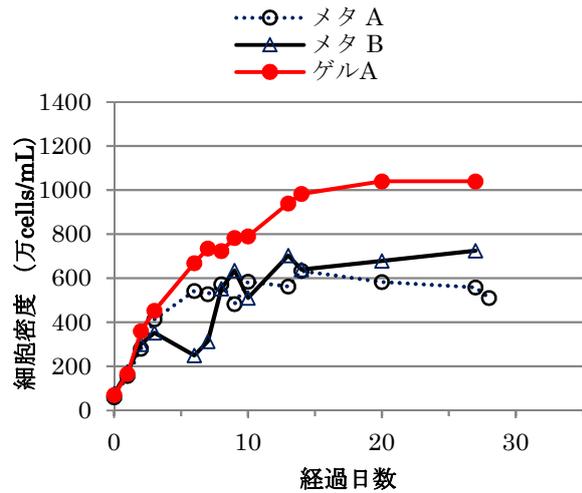


図4 ゲルカルチャー効果試験IVの結果

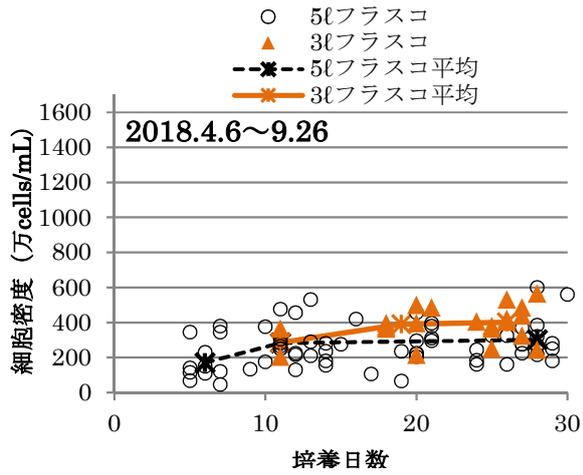


図5 第1・2回幼生飼育時の*C. neogracile*の増殖

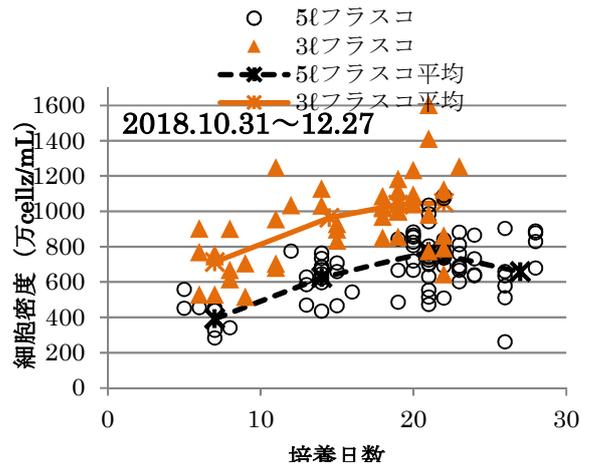


図6 第3回幼生飼育時の*C. neogracile*の増殖

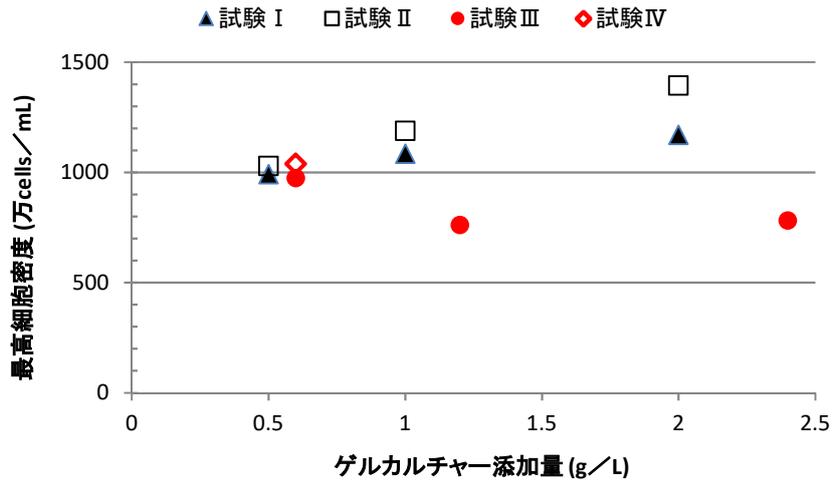


図7 ゲルカルチャー添加量と*C. gracilis*の最高細胞密度