水産増殖（*Suisanzoshoku*） **52**(1), 11－16（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

綿貫　啓[1]・廣瀬紀一[1]・門谷　茂[2]

Development of Semi-continuous Culture System for *Chaetoceros gracilis* Using Algae Propagation Water Soluble Glass

Akira WATANUKI[1], Norikazu HIROSE[1] and Shigeru MONTANI[2]

Abstract: Mass mortality in pearl oyster farming by virus infection has become a serious problem. This occurs due to food shortages in the summer. An experiment was conducted on the hypothesis that with artificial feeding, the mass mortality could be decreased. A low cost semi-continuous culture system, outdoors for *Chaetoceros gracilis* is required. The object of such a system would be to achieve a supply of 600 *l* culture solution in chlorophyll *a* of 600 μg/*l* per day using four 500 *l* tanks. In a continuous culture system, the cost of addition of nutrients is high so. A simple semi-continuous system was utilized using algae propagation water soluble glass to release trace minerals and nutrients (e.g. silicate, phosphorus, iron) along with nitrogenous fertilizer. It proved possible to control the rate and amount of dissolution. As a result of cultivating with this system during the summer, chlorophyll *a*, 550 to 850 μg/*l* and 290 to 370 million cells/*ml* were produced on average. Cultivation of *C. gracilis* outdoors was achieved in high concentration.

Key words: Algae propagation water soluble glass; *Chaetoceros gracilis*; Semi-continuous culture

1996年の夏より全国の真珠，真珠母貝生産地において，アコヤガイ *Pinctada fucata martensii* の大量死亡が発生している。大量死亡の原因は感染症との見方が強いが，餌料不足となる夏季以降に発生している。著者らは，餌料不足時に人為的にアコヤガイに餌料を供給し，体力をつけさせることで，感染症を発症しにくくでき，死亡率を低減することが出来るとの仮説を立てた。

真珠，母貝養殖は無給餌養殖であり，実証実験を行うに当たって，餌料供給システムを考案した。これは海域に半閉鎖系のシート水槽を設け，アコヤガイを収容し，屋外で大量培養した餌料を供給するものである。この中で重要となるのが，餌料を大量に安定して培養する技術である。

今回，目標とした餌料培養システムは，シート水槽等の規模から，珪藻 *Chaetoceros gracilis* をクロロフィルa量600 μg/*l* のレベルで毎日600 *l* 以上生産できる簡易で安価なシステムである。

なお，従来から，二枚貝や甲殻類の種苗生産施設では，餌料として微細藻類の培養が行われている。例えば，*Pavlova lutheri* は恒温培養室で白色蛍光灯管を光源とし，培地を調合して培養を行っている（林・瀬古 1985）。また，*Chaetoceros neogralile* は，高圧滅菌したGuillard F培養液を用い，室内培養した後，栄養塩類を再添加して，数日間屋外で培養し，*Tetraselmis tetrathele* は，滅菌した海水にES-T.T.の栄養塩を添加したものを培養液として用い，屋外培養され，餌料として用いられている（黒川ら 1999）。

しかし，これらの培養は培地の作製，培養容器の洗浄，滅菌作業等に人手がかかり，屋内培養では室温，照度等の適正な培養環境の維持のため，光熱費がかかる。さらに，施設や人員の面から大量培養することも難しいのが現状である。また，維持管理が容易で，高濃度に安定して連続培養できる微細藻類の連続培養装

2003年7月18日受付：2003年12月22日受理.
[1]株式会社テトラ　テトラ総合技術研究所（Tetra Co. Ltd., Tetra Technical Research Institute, Tsuchiura, Ibaraki 300-0006, Japan）.
[2]北海道大学大学院水産科学研究科（Hokkaido University, Graduate School of Fisheries Sciences, Hakodate, Hokkaido 041-8611, Japan）.

置が市販されているが，装置が複雑であり，価格も高価である。

著者らは，1999年より現地実験を開始し，2001年には，培養システムを完成することができたので報告する。

材料および方法

培養実施箇所と期間　アコヤガイへの餌料供給実験を実施した愛媛県南宇和郡内海村家串地先で *C. gracilis*の培養を行った（Fig. 1）。当地域は真珠母貝養殖の盛んな地域である。*C. gracilis* の培養は，2001年6月より2001年10月まで行った。

藻類増殖用水溶性ガラス　培養システムの開発に先立ち，藻類増殖用水溶性ガラスの技術の応用を考え，これを用いて，連続培養を可能とする方法を検討した。藻類増殖用水溶性ガラスは，藻類の増殖を促進する成分である鉄，シリカ，リン等の成分をイオンの状態で，水中で継続的に安定して，徐々に溶出する水溶性ガラスであり，海藻類の生長，珪藻等の微細藻類の増殖に効果がある（廣瀬ら 1999）。溶出速度や期間は水温や流れによって変化するが，ガラス粒度を調整することで制御することができる。

今回用いた藻類増殖用水溶性ガラスは，シリカの溶出に特化したS（商品名：イオンカルチャーS），リンに特化したP（商品名：イオンカルチャーP），鉄に特化したF（商品名：イオンカルチャーF）である。Table 1に各水溶性ガラスの成分を示す。また，Fig. 2に粒度1.0～1.4 mmのガラスを用い，水温を変えた場合の実験室内での溶出特性を示す。なお，窒素はガラスに含有させることができないので，窒素として農業用肥料（商品名：NKロング203,70タイプ）を用いた。

通常の連続培養装置では，培地成分を添加するための装置が必要となるが，考案したシステムでは，藻類増殖用水溶性ガラスから栄養塩，微量元素が徐々に一定の速度で溶出するので，培地の添加が不必要となり，簡易な半連続培養が可能となる。

初期培養の装置と方法　今回培養した *C. gracilis*（高温耐性株）の元株は，独立行政法人養殖研究所育種研

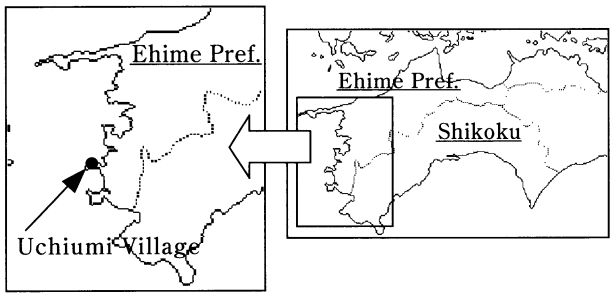

Fig. 1. Experimental site.

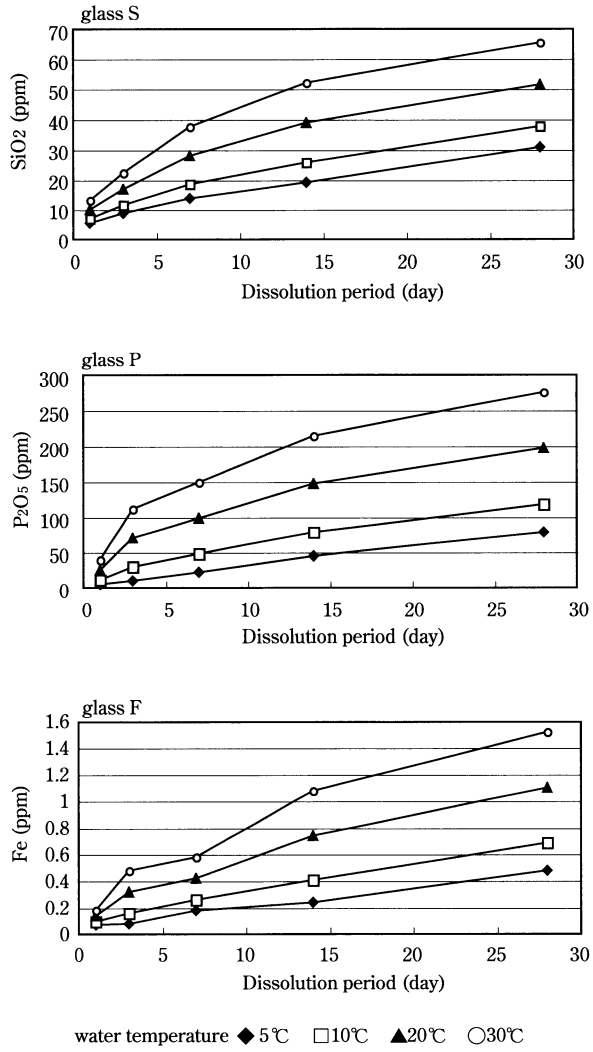

Fig. 2. Dissolution concentration from each glass.

Table 1. Components of algae propagation glass

Type	SiO_2	Na_2O	K_2O	FeO	Fe_2O_3	B_2O_3	P_2O_5	NO_3	NH_4
glass S	45.0	10.0	–	–	–	45.0	–		
glass P	51.1	–	30.0	11.4	2.9	–	4.6		
glass F	30.0	2.4	7.3	6.1	1.7	52.5	–		
N fertilizer			13.0					10.0	10.0

Unit: weight %

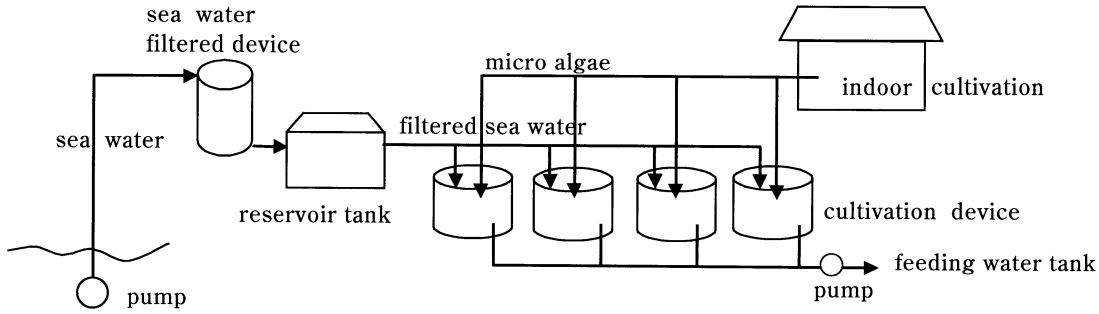

Fig. 3. Micro algae cultivation system.

究室から提供を受けた。コンタミネーションを防ぐために初期培養は屋内で実施した。内海村海洋資源開発センターの培養室において，室温25℃，24時間明条件で培養を行った。初期培養では，3 *l* フラスコで4日間培養し，30 *l* 水槽に植継いだ後，さらに4日間培養した。培地は，市販の液体培地KW21（第一製網製）1 *l* に珪酸ナトリウム45 mg を添加したものを海水1 *l* に対し，1 *ml* を加えた。培養に用いる海水は，植え継ぎ前日に，海水1 *l* に対し次亜塩素酸ナトリウム0.1 *ml* で殺菌し，約6時間後に0.5 mol/*l* チオ硫酸ナトリウム0.3 *ml* で中和した。

屋外培養の装置　屋外培養の装置は，海水濾過装置と培養装置に分けることができる（Fig. 3）。培養に用いる濾過海水は，現場海水をポンプで汲み上げ，砂濾過槽，中空糸膜フィルター1 μm，0.45 μm を通過させ，濾過海水用のタンク（1000 *l*）に一時的に貯水した。貯水中の海水は紫外線殺菌灯内を循環させた。なお，砂濾過槽は直径80 cm のステンレス管（長さ1.2 m）にゼオライト（粒径20～30 mm）を20 cm，砂（粒径2～3 mm）を60 cm，砕石（粒径30～50 mm）を20 cm の厚さに敷いた。

培養には，500 *l* パンライト水槽4槽（水槽①～④）を用いた。水槽には雨水が入らないようアクリル板の蓋をかぶせた。水槽および蓋には，水温の上昇と藻類の増殖に有害な紫外線の入射を防ぐため，赤外線（波長780～2100 nm）を63％カット，紫外線（波長340 nm 以下）の透過率が1％以下となるフィルム（商品名：レイシェード）を貼り付けた。また，水温制御用の冷却機（200 W），高濃度時の光量不足を補う水中蛍光灯（20 W）およびエアレーション用のエアーポンプ（風量60 *l*/min）を設置した（Fig. 4）。

なお，各500 *l* 水槽と濾過海水貯水タンクに取り付けたフロートスイッチ，各500 *l* 水槽と濾過海水貯水タンクを結ぶ電磁バルブ，ポンプ等を利用して，培養した *C. gracilis* を餌料として使用した後，500 *l* 水槽の水位が低下した分の濾過海水が自動で追加されるように設計した。

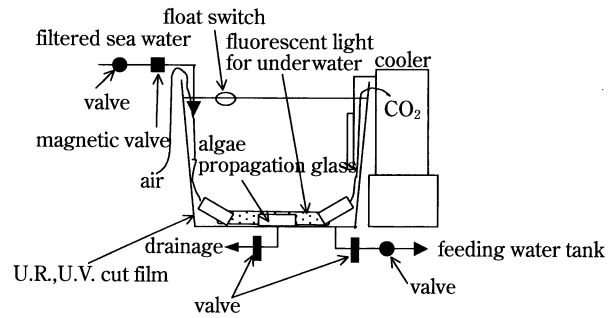

Fig. 4. Cultivation device with water cooler.

屋外培養の方法　初期培養した *C. gracilis* 培養液100 *l* を500 *l* 水槽に入れ，濾過海水を加え500 *l* とした。各水槽には藻類増殖用水溶性ガラスSおよびFを300 g，Pを150 g，窒素肥料を300 g それぞれ添加した。これらは，それぞれ不織布に入れたものをメッシュ袋に入れ，さらにプラスチック製のかごに収納してエアレーションのあたる位置に設置した。冷却機は水温が30℃を越えた段階で運転が始まる設定とした。水中蛍光灯は，事前の検討により，24時間点灯の場合と，夜間のみ点灯の場合とで *C. gracilis* の増殖状況に大差が見られなく，夜間は蛾等の虫が集まってくることと，周囲の住民への影響を考慮し，日中のみ点灯した。

培養サイクルは，1回の培養期間を原則8日間とし，8日毎に500 *l* 水槽を洗浄し，初期培養した *C. gracilis* 培養液100 *l* を500 *l* 水槽に入れる植継ぎ作業を繰り返した。水槽4槽を2槽ずつの2組に分け，組毎に4日の差をつけての植継ぎとした。各500 *l* 水槽から毎日16:00～翌10:00まで2時間毎に1回，各500 *l* 水槽から15 *l*，4槽合計で60 *l*，1日では600 *l* を餌料として利用した。藻類増殖用水溶性ガラスは16日ごとに新品と交換した。

測定項目と測定方法　*C. gracilis* の屋外培養に当たって，水温が培養の至適温度の範囲内にあること，藻類増殖用水溶性ガラスからの各成分の溶出が適正であることを確認するため，および培養状況の管理として，水温，栄養塩およびクロロフィルa量の測定を行った。

水温測定は冷却機のセンサーを利用して1日1回，栄養塩のNO_2-N，NO_3-N，PO_4-Pと$Si(OH)_4-Si$の濃度測定はパックテスト（共立理化学研究所製），NH_4-Nはアンモニアメータ（東興化学研究所製）を用いて1週間に2～3回測定した。クロロフィルa量は，キャリブレーションを行った蛍光光度計クロロテック（アレック電子製）を用いて測定した。クロロフィルa量の測定は1日1回行ったが，高濃度であるため，各水槽から採水した後，1000倍，500倍，333倍に希釈し，それぞれ3回の換算した値の平均値を求めて，クロロフィルa量とした。

結果および考察

ここでは，一般に*C. gracilis*の培養が困難といわれる夏季（水温26～34℃），2001年7月25日から8月28日の結果について示した。

クロロフィルa量の推移　各水槽および4水槽を平均したクロロフィルa量の推移をFig. 5に示した。培養方法で示したように，各水槽は原則として8日毎に植え継ぎを行っているが，8日未満，8日以上で植え継ぎを行っている場合もある。

各水槽のクロロフィルa量は，水槽①が836±562 μg/*l*，水槽②が547±233 μg/*l*，水槽③が602±300 μg/*l*，水槽④が556±281 μg/*l*となった。飼育水槽へは，4水槽から同時に供給するので，ここで重要となるクロロフィルa量は，4水槽の平均値となる。4水槽では，635±179 μg/*l*のクロロフィルa量となった。

なお，クロロフィルa量と細胞数との相関をとるため，培養期間中にクロロフィルa量の測定と同時に，トーマの血球盤を用いて細胞数の測定を11点行った。細胞数をx，クロロフィルa量をyとすると，$y=3.50x-455$（相関係数$r=0.80$）となる。これから換算すると，培養期間中の細胞数は約286万～367万cells/*ml*となった。

沖縄県水産試験場（1984）では，温室内で200 *l*のパンライト水槽を用いて*C. gracilis*を培養したところ，3～7日間で200～500万cells/*ml*の密度に増殖した。また，北海道立栽培漁業センターでは*Chaetoceros*を室内の7.7 *l*容器で培養したところ，14日程度で500万cells/*ml*に達した[3]。屋外での大量培養事例はないが，500 *l*水槽を用いた屋外での*C. gracilis*の培養として，今回の結果は高密度に培養できたものと考えられる。

Fig. 6に1日に餌料として利用した*C. gracilis*のクロロフィルa量と培養期間中に利用したクロロフィルa量の累積量を示す。なお，クロロフィルa量を測定した日のみについて示している。クロロフィルa量として，18日間で6862 mgが利用でき，1日では平均380 mgと大量の*C. gracilis*を生産，利用することができた。この値は，同海域の平均クロロフィルa量を1 μg/*l*とすると，380 m^3もの海水に匹敵する生物量を生産したことになる。

各500 *l*水槽の冷却機運転開始の設定を30℃にしたが，日中でも各水槽の水温が33℃を越えることはなかった。夜間はデータを取っていないが，1日の内，水温が低い早朝午前7～8時の水温は高いときでも28～29℃程度であった。

今回培養した*C. gracilis*は，培養至適温度が30℃で35℃程度まで順調に培養できると言われており，今回使用した冷却機は，気温が高い時期でも，能力的に十分であったといえる。

日照時間とクロロフィルa量の関係　培養期間中の天候は概ね晴天が続いたが，宇和島測候所の観測によると，8月1日に25.5 mm，15日に12.0 mmの降雨があり，8月21日には台風11号が接近したため，78.5 mmの大雨となった。Fig. 7には4水槽のクロロフィルa量の平均値と日照時間の推移を示す。日照時間と平均のクロロフィルa量はほぼ連動している。日照時間が

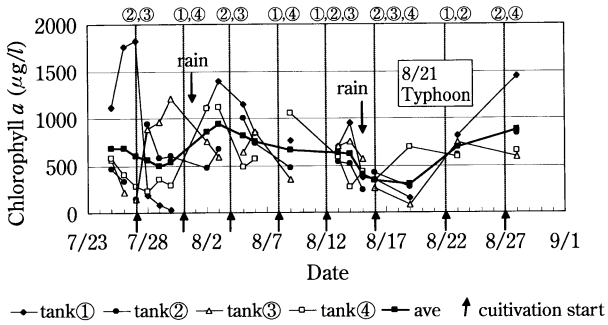

Fig. 5. Changes in chlorophyll *a* at each cultivation tank.

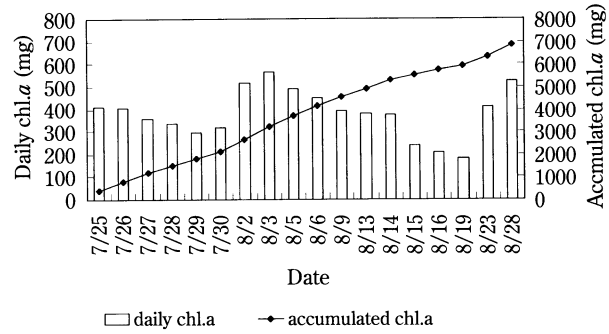

Fig. 6. Changes in daily chlorophyll *a* and accumulated chlorophyll *a*.

[3] 多田匡秀．つくり育てる漁業は豊かな餌づくりから（下）（2002）．試験研究は今．
http://www.fishexp.pref.hokkaido.jp/shikenima/451T0500/479/4790.htm

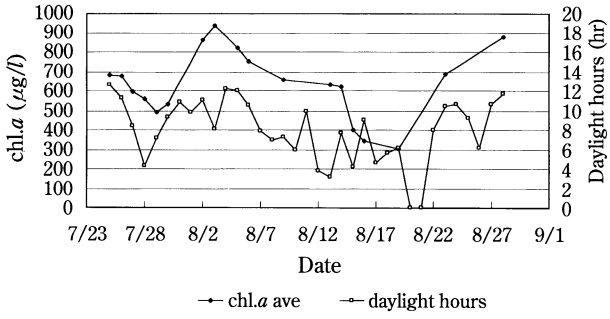

Fig. 7. Changes in chlorophyll *a* and daylight hours.

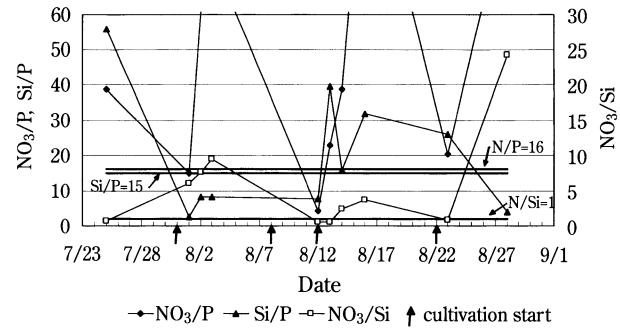

Fig. 9. Ratio of each nutrient at cultivation tank ①.

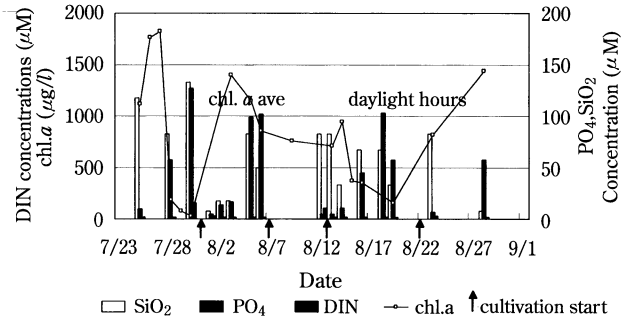

Fig. 8. Changes in nutrient concentrations and chlorophyll *a* at cultivation water tank ①.

少ないと，クロロフィルa量も少なく，このシステムは天候の影響を受けやすいが，可塑性もまた高いことが示唆された。

屋外培養の問題点の一つとして，天候による生産量のばらつきがあげられる。このシステムはこの問題点を解消できておらず，今後の改良が必要である。

栄養塩濃度　アンモニア態窒素は300μMを越えると *C. gracilis* の増殖に悪影響を与える（東ら 未発表データ）ことから，100μMを越えることのないよう管理を行った。Fig. 8に水槽①の栄養塩濃度とクロロフィルa量の測定結果を示す。

DINは48.4～1275μM，PO_4が2.1～16μM，SiO_2が8～133μMの範囲を変動している。水槽②，③および④もほぼ同様の値となっている。DINは非常に変動が激しく，500μMを越えた日が水槽①では8日ある。DINの各成分は図示していないが，これらはNO_3濃度が300～700μMと非常に高くなっているためである。*C. gracilis* の増殖が不調で，NO_3が取り込まれないために濃度が高くなるならば，この現象が理解できるが，必ずしも増殖が不調な場合にNO_3濃度が高くなっているわけではなく，NO_3濃度が突出する理由は不明である。また，アンモニア態窒素の濃度は，水槽①，③，④において，100μMを越えることがあった。この時の各水槽のクロロフィルa量は低くなっている場合もあるが，これは，コンタミネーションあるいは日照不足による増殖の不調であり，死滅期に入ったためにNH_4濃度が高くなったと考えられる。

藻類増殖用水溶性ガラスの添加量　Fig. 9に水槽①で測定された栄養塩の各成分の比を示す。なお，窒素については，*C. gracilis* が利用できるNO_3の値を用い，NO_3濃度が300μM以上と突出している日のデータは除いた。藻類増殖用水溶性ガラスの効率的な使用の面から，各成分の比はレッドフィールド比C:N:P:Si=106:16:1:15に近いことが望ましいと考えられる。Fig. 9より，各水槽の栄養塩の成分の比をレッドフィールド比（Fig. 9中にN/P=16，Si/P=15，N/Si=1を示す）に近づけるには，ばらつきはあるが藻類増殖用水溶性ガラスS, Pを2～3倍にするか，窒素肥料を1/2～1/3に減らすことで藻類増殖用水溶性ガラスを効率的に使用できると考えられる。添加量を減らすと，有効な溶出期間が短くなることが予想されるが，今回の16日毎の交換では，交換の際にも溶出量は使用開始時とさほど変化がなかったので，作業性やコストを考慮すると，添加量を減らす方向が望ましい。

以上に示したように，このシステムを使用した培養では，各500 *l* 水槽から1日あたり150 *l* の *C. gracilis* を餌料として使用した。培養開始日をずらすことによって，毎日培養した *C. gracilis* を餌料として利用しながらも，大量で高濃度かつ半連続的に *C. gracilis* を培養することができた。ただし，課題として，屋外培養での問題点である雨天時等の照度不足による培養の不調があり，水中蛍光灯を使用しているものの対策としては万全ではなく，効率的に照度を増す方法を検討する必要がある。また，今回の培養では冷却機を使用しているが，35℃まで培養可能であれば，冷却機を使用しなくても高濃度培養できる可能性があり，コストおよび維持管理の面から冷却機の使用についても検討していく。今後もこれらの事項について検討を重ね，完成度を高めていく必要がある。なお，アコヤガイへ給餌を行った結果については，別の機会に報告したい。

要　約

感染症によるアコヤガイの大量死亡が問題となっている。大量死亡が夏季の餌料不足時に生じることから，人為的に餌料を与えることで大量死亡を低減できると考え，実証実験を行った。

そのために，従来にない低コストで簡易な *Chaetoceros gracilis* の屋外大量培養技術が必要であり，500 *l* 水槽4槽を用いてクロロフィルa量600μg/*l* で毎日600 *l* の供給ができる半連続培養システムを目標とした。

連続培養でコストがかかるのが栄養塩の添加であるが，著者らの開発したシリカ，リン，鉄等が溶出する藻類増殖用水溶性ガラスと窒素肥料を培地に用いたので，簡易な半連続培養システムとなった。なお，藻類増殖用水溶性ガラスは成分の溶出量や溶出速度を制御することが可能である。

Chaetoceros を培養することが困難な夏季に *C. gracilis* を半連続培養した結果，平均的にクロロフィルa量で550～850μg/*l*，細胞数では約290万～370万cells/*ml* を生産，供給することができた。屋外での *C. gracilis* の培養として，高濃度に培養することができた。

謝　辞

今回の実験の実施に当たり，遊子漁業協同組合の古谷和夫前組合長，愛媛県水産試験場の佐野隆三顧問，内海漁業協同組合の山下九十九組合長，畑中俊三参事，浜田耕示氏に多大な協力をいただいた。独立行政法人養殖研究所の岡内正典室長には *C. gracilis* の提供，培養方法のアドバイスをいただいた。藻類増殖用水溶性ガラスは東洋ガラス株式会社の先納靖陛氏に提供いただいた。また，香川大学大学院生日比野一樹氏には共に現地実験に携わっていただいた。以上，ここに記して，感謝の意を表する。

文　献

沖縄県水産試験場（1984）昭和58年度指定調査研究総合助成事業報告書　シラヒゲウニ種苗生産研究．沖水試資料，**81**，5-6.

黒川忠英・鈴木　徹・岡内正典・三輪　理・永井清仁・中村弘二・本城凡夫・中島員洋・芦田勝郎・船越将二（1999）外套膜片移植および同居飼育によるアコヤガイ *Pinctada fucata martensii* の閉殻筋の赤変化を伴う疾病の人為的感染．日水試，**65**，241-251.

林　政博・瀬古慶子（1985）アコヤガイの種苗生産について．三重県水技研報，**1**，39-68.

廣瀬紀一・綿貫　啓・川嶋昭二・斎木正道・北尾修二（1999）北海道日本海側磯焼け海域における藻場造成－ウニの食害を排除した藻場造成－．海洋開発論文集，**15**，165-170.