

## 濃縮ナンノクロロプシスの保存と再培養

原田和弘\*・中本幸一\*・山本 強\*・金尾博和\*・杉野雅彦\*

### Preservation and Reculture of Concentrated *Nannochloropsis*

Kazuhiro HARADA\*, Koichi NAKAMOTO\*, Tsuyoshi YAMAMOTO\*,  
Hirokazu KANAOKA\*, and Masahiko SUGINO\*

種苗生産施設におけるナンノクロロプシスの屋外大量培養は、大規模な施設を必要とする他、梅雨などの天候不順期には、培養不調に陥ることがしばしば見られ、種苗生産事業の不安定要因となっている。また冬季に種苗生産を行う施設では、低温および日照不足などからナンノクロロプシスの増殖率が低下し、事業に影響を及ぼすことがある。このようにナンノクロロプシスの屋外大量培養は、天候などに大きく影響を受けるため、その克服が課題となっている。

そこで、ナンノクロロプシスの培養が順調な時期、もしくは種苗生産事業の端境期に濃縮ナンノクロロプシスを作製、保存しておいて種苗生産期並びに培養不調期に使用することは、非常に有効な対策と考えられる。さらに、濃縮したナンノクロロプシスの冷凍保存が可能になれば種の保存にも役立つと考えられる。

今回の試験では、近年種苗生産施設で導入され始めている、限外濾過膜方式の濃縮装置を用いてナンノクロロプシスを濃縮し、その簡易な保存方法を検討するとともに、保存した濃縮液を再培養の元種として用いることの可能性について検討した。

#### 材料と方法

**供試ナンノクロロプシス** 試験に使用したナンノクロロプシスは、当场で種苗生産事業等に使用するため常時培養管理しているものを用いた。その培養は、2500~3500万 cells/mlに達した培養液を植継ぎ時に、1200~1500万 cells/mlとなるように調整して行った。植継ぎ時の

培養水の調整には75%海水を補給し、施肥は補給水 1 k/l 当り硫安100 gおよび住友液肥1号(住友化学工業株式会社) 50 mlを添加した。なお、4~10月は、尿素20 gおよびクレワット32(帝国化学産業株式会社) 15 gをさらに追加した。また、ナンノクロロプシスの細胞数は、分光光度計(日立100-20、株式会社日立製作所)で吸光度を測定して次式で換算した。

$$N = (2.89X^2 + 3.72X + 0.07) \times 10^8$$

N : 細胞数 (10<sup>4</sup> cells/ml) X : OD560/100

OD560 : 波長560nmの吸光度の100倍値

細胞数換算範囲 : OD560値で7.5~104.1

**濃縮方法** ナンノクロロプシスの濃縮には、中空糸膜の限外濾過方式の装置(三井造船株式会社製 MF精密濾過装置 4M-1型)を用いた。濃縮装置の多孔質中空糸膜カートリッジ仕様は、中空糸素材-ポリプロピレン多孔質中空糸膜、中空糸外径/内径-650 μm/350 μmであった。濃縮は約3000万 cells/mlの培養液を容量で1/100にすることを目標に行った。その結果は、第1表に示したとおりである。

**屋外再培養試験** ナンノクロロプシスは、1991年2月21日に濃縮したものを使用した。濃縮液は、直ちにポリ袋(約10 l)に密封して、冷蔵庫(約5~10℃)に収容し、再培養のサンプルを取る際に攪拌混合した。

再培養試験は、冷蔵保存後13, 20, 25, 32, 40, 50, 60および70日(1991年3月6日~5月13日)に行った。

再培養は、屋外で100 l透明円形水槽を用いて水量60 l、

\* 兵庫県立水産試験場 (Hyogo Prefectural Fisheries Experimental Station, Minami-Futami, Akashi 674)

第1表 限外濾過膜方式によるナンノクロロブシスの濃縮結果

年月日	濃縮前の OD560	濃縮前の 細胞数 (万cells/ml)	濃縮に使用した ナンノの量(kl)	濃縮後の OD560	濃縮後の 細胞数 (億cells/ml)	濃縮後の ナンノの量(l)
1991.2.21	59.0	3.271	—	10.300	57.2	—
3.27	63.3	3.583	2.0	5.700	32.2	20
4.5	58.8	3.257	3.0	10.950	60.6	15
4.11	58.9	3.264	—	8.070	44.7	—

注) 濃縮後のOD560および濃縮後の細胞数は、濃縮液を希釈して換算した。

75%海水で行った。通気は小型エアーストーンを使用し、細胞数の増加にともなって徐々に強めた。培養開始時の細胞密度は、OD560=25程度とした。試験区は、冷蔵保存区(濃縮液を冷蔵保存)と対照区(屋外で大量培養されている対数増殖後期のナンノクロロブシスを植え継ぎして培養したもの。つまり濃縮していない通常の培養)の2区を設定した。

また、冷蔵保存区は培養水60lあたり硫酸6gと住友液肥1号3mlを添加し、対照区には培養開始時に新水10lあたり硫酸1gと住友液肥1号0.5mlの肥料を添加した。

**室内再培養試験** 冷凍および冷蔵保存試験に使用したナンノクロロブシスは、1991年3月27日に濃縮したものをを用いた。対照区として、1991年4月5、11日に濃縮したものを、濃縮後直ちに培養を開始した。濃縮液の保存と再培養の方法は、以下の通りである。

#### ・冷蔵保存

濃縮したナンノクロロブシスを100mlずつサンプル瓶に収容して、1℃に設定したインキュベーター内に保存した。冷蔵保存は、N区(濃縮液を毎日1回攪拌混合して静置)およびM区(濃縮液の上澄みを5日毎に滅菌75%海水と交換し攪拌混合して静置)の2区を設定した。

#### ・冷凍保存

濃縮したナンノクロロブシスを100mlずつポリ袋に密封後、まず-20℃に24時間保存した後-20、-40および-80℃冷凍庫に保存した。

なお、冷蔵および冷凍保存とも濃縮したナンノクロロブシス液をそのまま保存し、凍害防御剤などは用いなか

った。

#### ・再培養

冷蔵保存後10、20、30、40および51日(1991年4月6日~5月24日)と、冷凍保存後10、20、30および46日(1991年4月6日~5月23日)に再培養を開始した。試験は、恒温室内(約21℃に設定)で行った。培養は、1lビーカーに75%海水1lを入れて行い、白色蛍光灯を用いてビーカーの側面から当たるように照明を行った。(10,000lx、12時間明-12時間暗)通気は、ガラス管を用いて約580ml/minを目安に行い、培養液の飛散を防ぐため、ビーカーの上面を透明アクリル板で覆った。また、培養開始時の細胞密度はOD560=10程度とした。試験区は、冷蔵保存区(NおよびM区各2例)、冷凍保存区(-20、-40および-80℃区各2例)を設定した。

肥料は、1l当り硫酸100mg、住友液肥1号50μl、尿素20mgおよびクレワット32 15mg添加した。

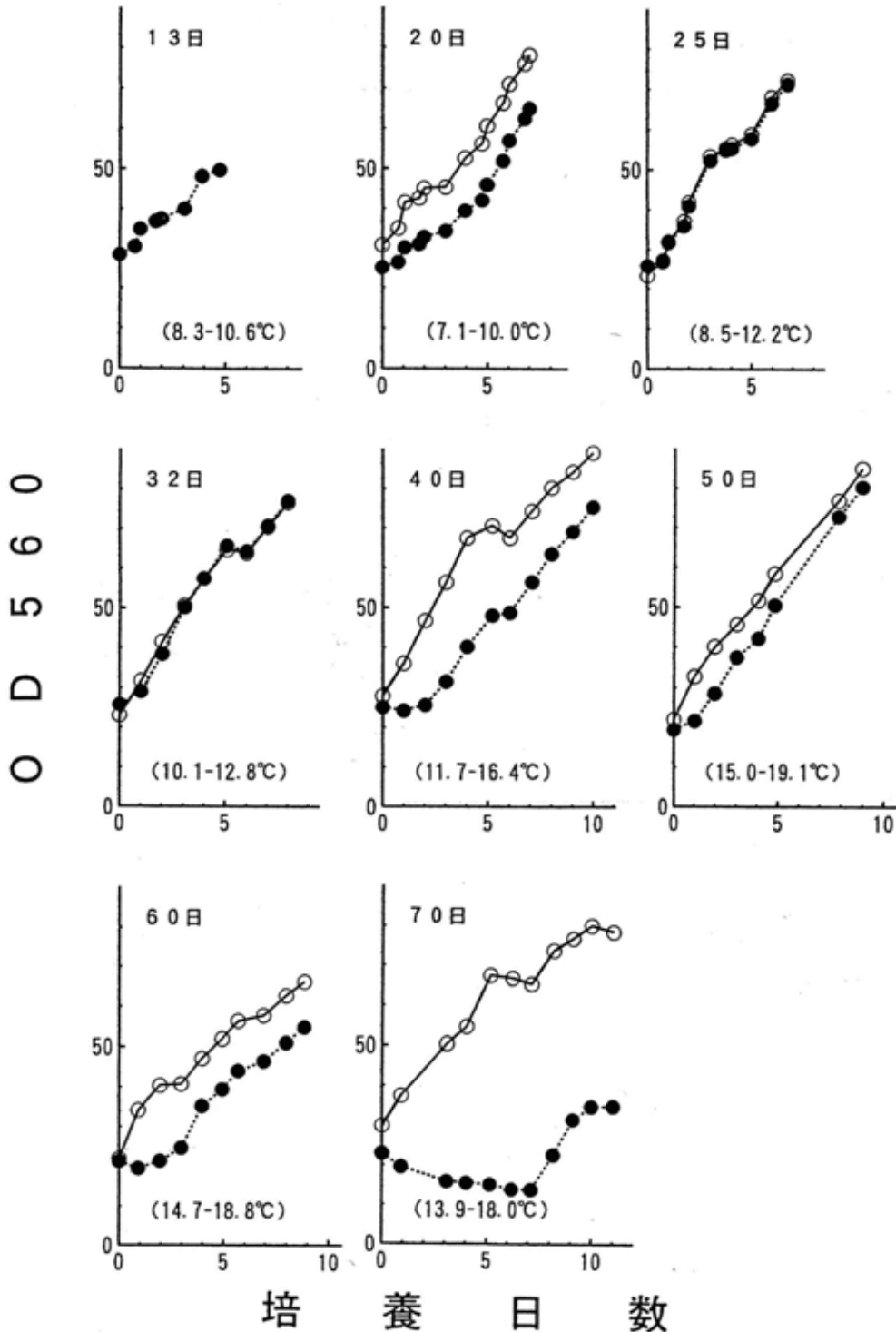
なお、冷凍保存していた濃縮ナンノクロロブシスは、杉山らの報告<sup>1)</sup>に準じて、35℃に設定した加温水中で解凍後使用した。

## 結果

**屋外再培養試験** 冷蔵保存日数別の再培養試験結果を第1図に示した。保存日数60日までの再培養結果は、やや対照区の方が良いものの、ほぼ同様の増殖がみられた。しかし、保存日数70日では対照区に比べて増殖開始が7日程度遅れた。また濃縮液のOD560値も保存後70日にはそれ以前よりも低下していた。なお、再培養期間中の

水温変化については、同時期の屋外大量培養の水温を参考として記載した。濃縮液の上澄が、細菌、糸状菌等により黄色に変色し、保存後30日頃からは腐敗臭が感じられた。

また濃縮ナンノクロロプシスの保存状況は、静置保存



第1図 限外濾過膜方式で濃縮した後、冷蔵保存したナンノクロロプシス屋外再培養における増殖結果

○：対照区\*，●：冷蔵保存区

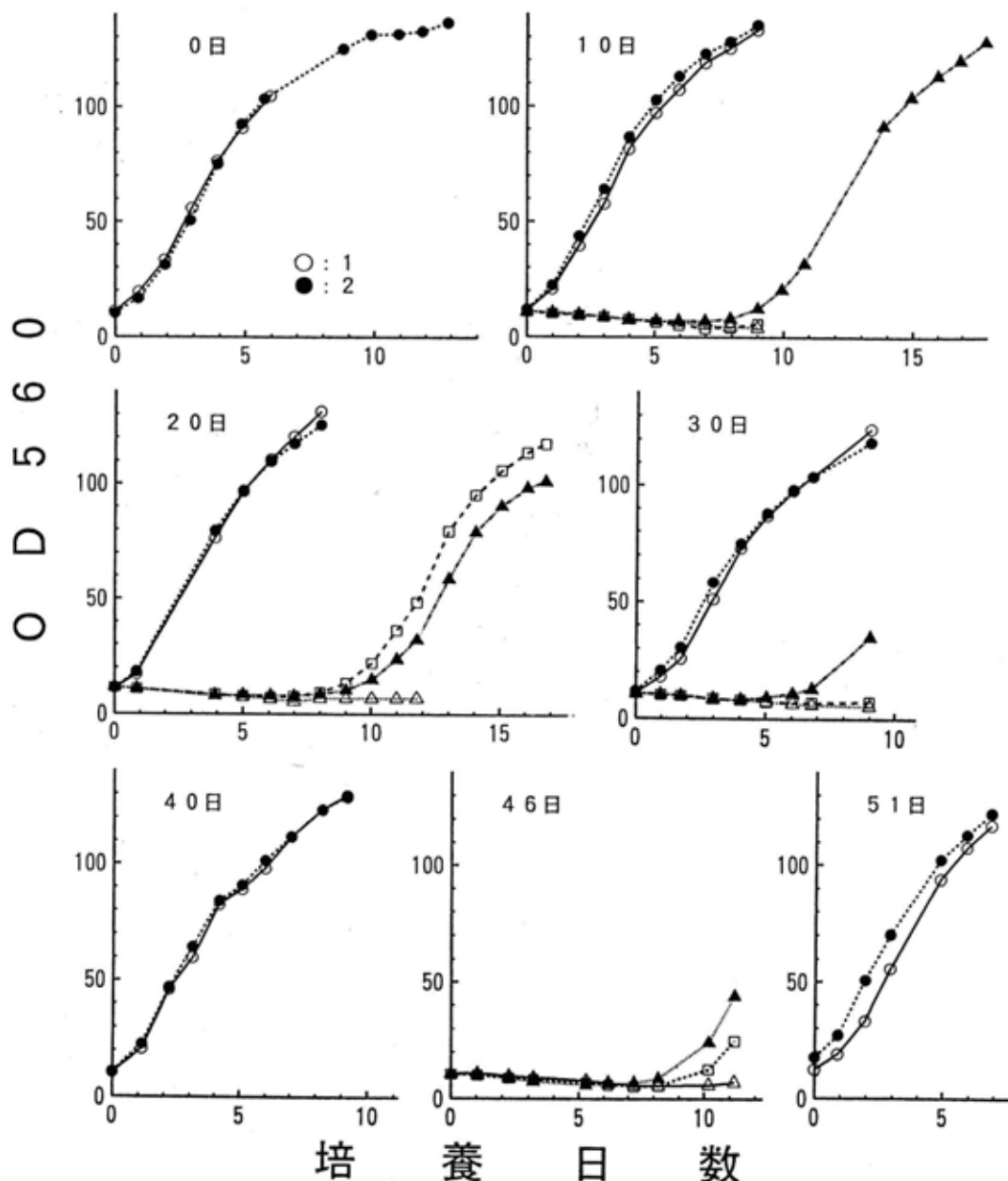
\* 大量培養していたものを植継いで培養（濃縮液ではない）

注）図中の日数は、冷蔵保存日数を示し、カッコ内の数値は再培養期間中の水温（平均最低水温－平均最高水温℃）を表している。

**室内再培養試験** 冷凍および冷蔵保存日数別の再培養試験結果を第2図に、冷蔵保存区の再培養6日目までの日間増殖量を第2表に示した。いずれの試験区も冷凍区の一部を除いて、同条件2例の平均値で示した。恒温室の温度調整故障により培養水温が徐々に上がっているが、冷蔵保存区では保存後51日まで、対照区とほぼ同様の増殖を示した。また、N区とM区もほとんど差は見られなかった。冷凍保存区は、 $-80^{\circ}\text{C}$ 区において、増殖開始が

対照区および冷蔵区よりも8日程度遅れるものの、保存後46日までの再生試験では、再生が見られた。また、 $-40^{\circ}\text{C}$ 区も一部再生が見られたが、 $-20^{\circ}\text{C}$ 区は再培養後10日程度では増殖の兆しはほとんど見られなかった。

濃縮ナンノクロロプシスの冷蔵保存状況は、上澄を滅菌海水と交換した区(M区)は徐々に上澄液が透明になり、N区に比べて細菌等の繁殖が少ない様子であった。



第2図 限外濾過膜方式で濃縮した後、冷蔵および冷凍保存したナンノクロロプシスの室内再培養における増殖結果  
 ○：冷蔵保存N区<sup>\*1</sup>，●：冷蔵保存M区<sup>\*\*</sup>，▲： $-80^{\circ}\text{C}$ 保存区，□： $-40^{\circ}\text{C}$ 保存区，△： $-20^{\circ}\text{C}$ 保存区  
<sup>\*1</sup> 冷蔵保存N区：濃縮液を毎日1回攪拌混合して冷蔵保存したもの  
<sup>\*\*</sup> 冷蔵保存M区：濃縮液の上澄みを5日毎に滅菌75%濾過海水と交換し冷蔵保存したもの  
 注) 図中の日数は保存日数を示す。  
 ・保存日数0日の1と2は、異なる濃縮液で2回試験を行った結果(濃縮後直ちに培養したもの)

考察

微細藻類の保存方法について、梅林<sup>2)</sup>は5種類の珪藻を家庭用冷蔵庫に保存し、*Skeletonema*, *Cyclotella* および *Chaetoceros* は9カ月、*Phaeodactylum* は25カ月、*Nitzschia* では34カ月保存した後に再生がみられたことを報告しており、岡内<sup>3)</sup>はテトラセルミスは0~2°Cの冷蔵庫で大量培養の元種として2カ月保存可能であると報告している。また杉山ら<sup>4)</sup>は、微細藻類を-70°Cで凍結保存し、海産クロレラは凍害防御剤の有無に関係なく1年間保存が可能で、テトラセルミス、キートセロスについても凍害防御剤含有培地で1年間の保存が可能であると報告している。

今回の試験では、濃縮したナンノクロロプシスを冷蔵または冷凍保存した後、大量培養の元種として用いる可能性を検討した。今回の試験結果から、約30~60億 cells/mlに濃縮したナンノクロロプシスは実用性を考慮した場合、約2カ月程度の冷蔵保存後に培養の元種として用いることが可能であるとの結果が得られた。しかし、冷蔵保存では保存後1カ月を経過すると腐敗臭が感じられたので、さらに保存方法の検討を行なう必要があると思われる。また、社団法人日本栽培漁業協会上浦事業場<sup>1)</sup> および屋島事業場<sup>7)</sup> では、連続遠心機や限外濾過膜濃縮装置を使用し、作成した濃縮ナンノクロロプシスを弱通気しながら冷蔵保存し、数十日~数百日の保存後に再生が見られている。このことから濃縮ナンノクロロプシスの冷蔵保存は、静置保存よりも沈殿しないように常に弱通気をかけて攪拌しながら保存した方が長期間保存可能と思われる。

また冷凍保存については-80°Cで再生の可能性がみられたが、再培養の増殖開始日数の遅れなどから、実用に向けては凍結方法等の検討が必要と思われる。

以上のことから、さらに濃縮濃度、保存温度、凍結方法等について検討を加えれば、活性を維持した状態で長期保存は可能であると思われる。

第2表 限外濾過膜方式によって濃縮したナンノクロロプシスの室内再培養における日間増殖量

培養日数	0日		10日		20日		30日		40日		51日	
	1 <sup>*1</sup>	2	N <sup>*2</sup>	M	N	M	N	M	N	M	N	M
1日	402.9	315.8	436.7	492.5	311.7	344.6	344.6	424.0	438.8	562.4	332.2	453.8
2	647.4	674.7	876.3	998.4	377.7	466.6	377.7	466.6	1,191.0	1,129.3	656.5	1,103.8
3	1,063.4	905.3	842.8	954.1	**	**	1,206.5	1,332.8	633.9	814.2	1,053.3	910.1
4	949.2	1,165.2	1,114.0	1,048.3	3,306.5	3,443.6	1,023.3	762.5	1,063.4	910.1	**	**
5	665.6	800.1	729.9	748.5	924.7	809.5	638.4	615.9	332.2	336.3	1,918.7	1,561.9
6	647.4	518.5	470.9	483.8	647.4	589.1	509.8	475.2	428.2	496.8	624.9	496.8
平均日間増殖量	729.3	729.9	745.1	787.6	865.1	864.5	683.4	679.5	688.7	708.2	764.3	754.4
平均培養水温	21.2	21.4	21.9	22.3	21.5	21.6	22.5	22.8	22.6	22.7	24.7	24.7

注) 数値は、培養6日目までの日間増殖量(単位: 万cells/ml)を示した。

\*1 保存日数0日と1と2とは、異なる濃縮液で2回試験を行った結果。

\*2 N: 濃縮液を毎日1回攪拌混合して冷蔵保存したもの。M: 濃縮液の上澄みを5日毎に滅菌75%濾過海水と交換し冷蔵保存したもの。

\*3 保存日数20日の培養日数4日目の数値は、2~4日目の総増殖量を示している。

\*4 保存日数51日の培養日数5日目の数値は、4~5日目の総増殖量を示している。

## 要約

- 1) 屋外で大量培養されているナンノクロロプシスを限外濾過膜方式で濃縮し、簡易な方法で冷蔵および冷凍保存した後、再培養の元種として利用する可能性について検討した。
- 2) 濃縮ナンノクロロプシスは、ほとんど静置した状態でも約2カ月の冷蔵保存後に、大量培養の元種として用いることが可能である結果が得られた。また-80℃の冷凍保存でも増殖開始が遅れるものの再生の可能性が見られた。

## 謝辞

本試験を行うに当たり、限外濾過膜方式の濃縮装置の貸与、また御協力頂いた三井造船株式会社事業推進本部機能膜グループの荒川 正氏をはじめ、同社の皆様から感謝の意を表します。

## 文献

- 1) 杉山昭博・金城盛徳：海産微細藻類の凍結保存について，水産増殖，36(3)，253-258 (1988)。
- 2) O. Umebayasi : Preservation of some cultured diatoms, *Bull. Tokai. Reg. Fish. Res. Lab.*, (69), 55-62 (1972)。
- 3) 岡内正典：テトラセルミス *Tetraselmis tetrathele* の大量培養法と餌料価値，栽培技研，14(2)，85-110 (1985)。
- 4) 社団法人日本栽培漁業協会：日本栽培漁業協会事業年報 昭和59年度，86-87 (1985)。
- 5) 社団法人日本栽培漁業協会：日本栽培漁業協会事業年報 昭和60年度，104-106 (1986)。
- 6) 社団法人日本栽培漁業協会：日本栽培漁業協会事業年報 昭和62年度，83 (1989)。
- 7) 社団法人日本栽培漁業協会：日本栽培漁業協会事業年報 平成2年度，109-110 (1992)。