

餌料用微細藻類培養におけるチオ硫酸ナトリウム($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$)の影響について

田邊 徹*

The Influence of the Sodium Thiosulfate ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$) in Micro Algae Culture

Toru TANABE*

キーワード：チオ硫酸ナトリウム($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$)、微細藻類、増殖抑制

二枚貝類の種苗生産現場では、餌料となる微細藻類の安定培養は非常に重要である。微細藻類を培養する際、目的の藻類を効果的に培養するため、海水中に生息する原生動物、目的外の藻類及びバクテリアの除去等を目的として物理的あるいは化学的な処理が重要な工程となっている。小規模であれば加熱加圧滅菌が用いられるが、培養規模が大きい場合、次亜塩素酸ナトリウムによる化学的処理や紫外線照射による殺菌、膜濾過などの除菌も行われる。このうち、次亜塩素酸ナトリウムによる殺菌は、専用の設備がほとんどいないことから非常によく用いられる方法である。

しかし、次亜塩素酸ナトリウムにより殺菌を行った場合、一般的に残留した塩素は生物に悪影響をもたらす。このため、チオ硫酸ナトリウムによる中和が行われることが多いが、チオ硫酸ナトリウムで中和した海水で藻類を培養した際に、まれに培養液が白濁し、培養不調に陥ることがある。

本報では、この不調の要因を明らかにするため、滅菌下及び種苗生産現場に準じた非滅菌下で培養実験によりチオ硫酸ナトリウムの微細藻類に対する影響について検討したので報告する。

材料と方法

使用した微細藻類株は国のジーンバンク事業により国立研究開発法人水産研究・教育機構、増養殖研究所が保管している株を譲り受け、液体培地で保存培養したものをを用いた。使用した種類は珪藻類 *Phaeodactylum tricornutum* 及び *Chaetoceros neogracile*、ハプト藻 *Pavlova lutheri*、プラシノ藻 *Tetraselmis tetrahele* を用いた(表1)。

表1 使用した微細藻類及び初期細胞密度

種名	区分	初期細胞密度cells/ml	
		滅菌海水	非滅菌海水
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	珪藻類	104,000	176,000
<i>Chaetoceros neogracile</i>	珪藻類	192,000	192,000
<i>Pavlova lutheri</i>	ハプト藻類	320,000	136,000
<i>Tetraselmis tetrahele</i>	プラシノ藻類	112,000	112,000

1 μm ワインドタイプのフィルターで濾過した海水1 l にゲルカルチャー(第一製網株式会社)数個を入れたものを2個用意し、一つは120 $^{\circ}\text{C}$ 20分間滅菌、もう一つについては滅菌せず、20 $^{\circ}\text{C}$ で24時間静置したものを培養液のベースとし、KW21(第一製網株式会社)をそれぞれ500 μl 添加したものを培養液とした。

チオ硫酸ナトリウムは、通常種苗生産時に粗放培養で用いる工業規格のものをを用い、20 $^{\circ}\text{C}$ で脱イオン水中に飽和量溶解し24時間静置したものを、所定の濃度に希釈し

*水産技術総合センター気仙沼水産試験場

て用いた。20℃での飽和チオ硫酸ナトリウム水溶液は2.5 mol/lに相当することから、以下の試験はmol濃度に換算し行った。また、それぞれの実験区におけるチオ硫酸

表2 チオ硫酸ナトリウム($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$)の換算濃度

試験区分	$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ (無水)濃度換算	
飽和 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 溶液/試験培養液	mol濃度換算	算 (g/vol)
control	0	0
1×10^{-8}	2.5×10^{-8}	40ppb
1×10^{-7}	2.5×10^{-7}	0.04ppm
1×10^{-6}	2.5×10^{-6}	0.4ppm
1×10^{-5}	2.5×10^{-5}	4ppm
1×10^{-4}	2.5×10^{-4}	40ppm
1×10^{-3}	2.5×10^{-3}	0.04%
1×10^{-2}	2.5×10^{-2}	0.40%

酸ナトリウムの濃度を表2に示した。

培養試験は24穴マイクロウェルプレートに最終体積が2 mlとなるように培養液及び試料を添加した。すなわち、試験区は培養液1.6 ml, チオ硫酸ナトリウム水溶液0.2 ml, 微細藻類培養元株0.2 mlの組成で混和し、対照区は

チオ硫酸ナトリウム水溶液ではなく脱イオン水を0.2 ml添加した。それぞれの微細藻類の初期細胞密度は表1に示した。培養は22℃, 白色LEDによる2,900 Lux終日照明下とし、滅菌海水を使用した試験区については培養開始4日後及び10日後, 非滅菌海水を使用した試験区については培養開始4日後にThoma血球計算盤を用いて溶液中の微細藻類密度を生物顕微鏡下で計数した。また, 培養開始4日後の結果については, 以下の式により日間増殖率(Daily Population Growth Rate, 以下DPGR)を求め, 滅菌及び非滅菌の増殖状況について比較した。なお, 非滅菌海水区は10日後には目的の藻類以外の原生動物などの増殖が顕著で, 目的藻類の計数が困難であったことから評価の対象としなかった。

$$DPGR = D_4 / D_0 / T_4$$

ここで, D_0 は初期細胞密度, D_4 は4日後の細胞密度, T は培養日数を示す。

各試験区は, $n=3$ で行い, 各試験区間の検定を細胞密度及び日間増殖率をANOVAで, 滅菌及び非滅菌の区の4日後の増殖率の交互作用については2way-ANOVAにより

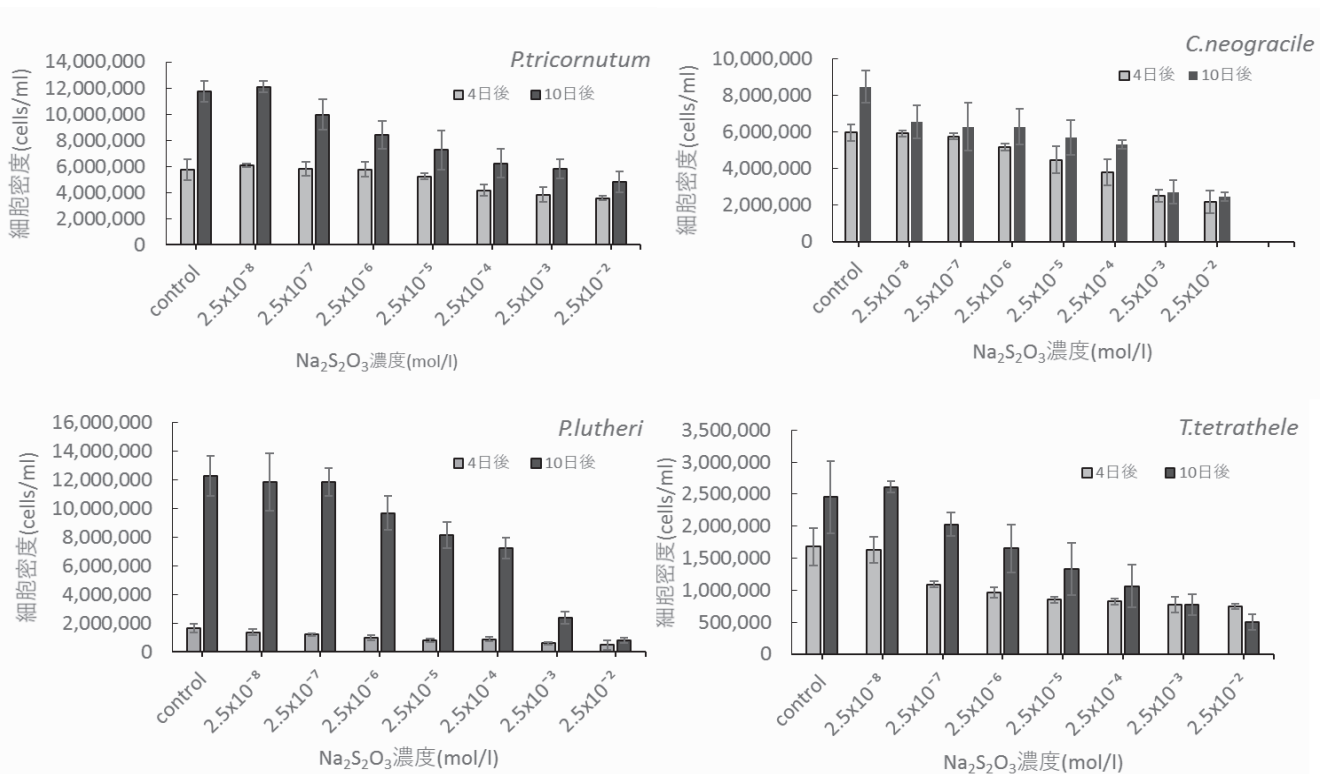


図1 異なるチオ硫酸ナトリウム($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$)濃度を添加した滅菌培養液中の餌料用微細藻類の細胞密度(cells/ml) いずれの藻類も, 4日後及び10日後ともに, チオ硫酸ナトリウム濃度別試験の細胞密度間で有意差あり(ANOVA, $p < 0.01$, $n=3$, \pm SD)。

行った。

また、対照区における滅菌海水区と非滅菌海水区間の日間増殖率の結果についてStudentの*t*検定により検定を行った。

結果

滅菌海水を使用した培養試験結果を図1に示した。ほとんどの試験区で、10日後の密度は4日後の細胞密度より高くなっており増殖が確認された。また、*P. tricornutum*、*C. neogracile*、*P. lutheri*では10日後の対照区では800万～1.2千万cells/ml程度、*T. tetrahele*で250万cells/mlと密度の増加がみられた。チオ硫酸ナトリウムを添加した試験区では、いずれの藻類においても有意にチオ硫酸ナトリウム濃度の増加とともに細胞密度が低下する傾向にあった($p<0.01$, ANOVA)。また*T. tetrahele*及び*C.*

*neogracile*ではチオ硫酸ナトリウム濃度が、 2.5×10^{-3} mol/l以上の区で4日後の細胞密度と10日後の細胞密度がほとんど変わらないあるいは減少する傾向がみられた。

非滅菌海水を使用した培養試験結果を図2に示した。いずれの藻類でも対象区では増殖が確認された。一方、チオ硫酸ナトリウムを添加した試験区では、いずれの藻類においても有意にチオ硫酸ナトリウムの増加とともに細胞密度が低下する傾向にあった($p<0.01$, ANOVA)。*P. tricornutum*及び*T. tetrahele*においては 2.5×10^{-3} mol/l以上の区で、*C. neogracile*及び*P. lutheri*では 2.5×10^{-5} mol/l以上の区で、初期細胞密度を下回る結果となった。また、いずれの藻類でも 2.5×10^{-3} mol/l以上のチオ硫酸ナトリウム添加区で、硫化水素臭を確認し、またこの濃度ではいずれのウェルにおいても白濁が確認された。

培養開始4日後の密度から求めた日間増殖率を図3に示した。図においてそれぞれの藻類の結果に記載している

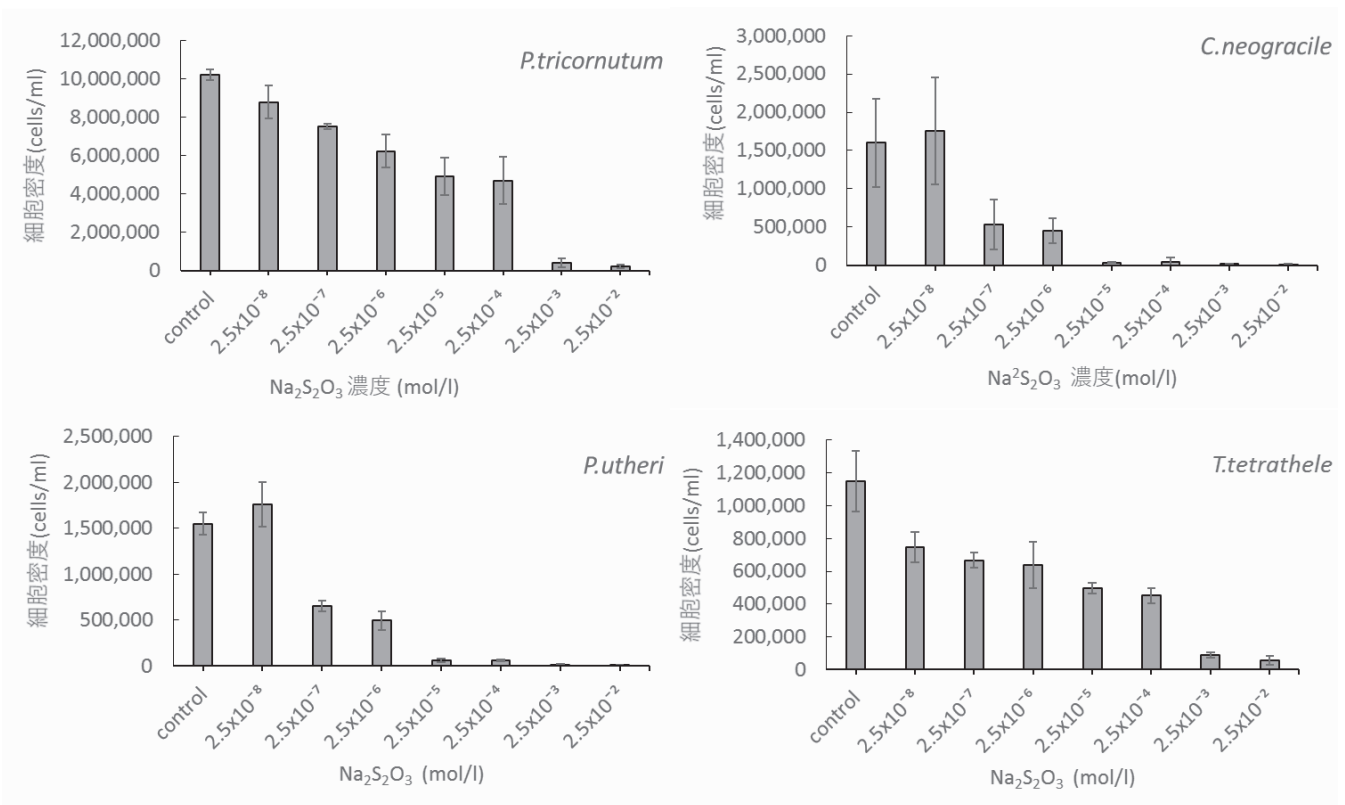


図2 異なるチオ硫酸ナトリウム ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$) 濃度を添加した非滅菌培養液中の餌料用微細藻類の細胞密度 (cells/ml) いずれの藻類も、チオ硫酸ナトリウム濃度別試験の細胞密度間で有意差あり (ANOVA, $p<0.01$, $n=3$, \pm SD)。

破線は、滅菌海水区における対照区の下限值である。非滅菌海水区ですべての区の増殖率が対照区の下限値を下回った濃度は、*P. tricornutum*では 2.5×10^{-4} mol/l以上、*C. neogracile*では 2.5×10^{-6} mol/l以上、*P. lutheri*及び*T. tetrahele*では 2.5×10^{-7} mol/l以上であった。対照区における日間増殖率は、*C. neogracile*では非滅菌海水区が滅菌海水区と比較し有意に低かったものの、その他の藻類では対照区間において有意な差は見られなかった。いずれの藻類も滅菌海水区及び非滅菌海水区でチオ硫酸ナトリウム濃度が増加するに従い増殖率が有意に低下した ($p < 0.01$, ANOVA)。また、滅菌海水区及び非滅菌海水区間の交互作用が確認された ($p < 0.01$, two-way ANOVA)。日間増殖率は同一のチオ硫酸ナトリウム濃度では非滅菌

海水区が滅菌海水区より低くなる傾向にあった。

考 察

今回の培養試験では、照度についてはいずれの種においても至適範囲にあるものの、温度についてはやや低かった¹⁾。しかし、滅菌海水を使用した試験ではいずれの試験区においても対照区で安定した増殖が確認され、培養試験は成立していると考えられる。滅菌海水区の結果では、いずれの種類においても、チオ硫酸ナトリウム濃度が高くなるほど、細胞密度が低くなる傾向を示し、チオ硫酸ナトリウムが微細藻類の増殖に好ましくない影響を及ぼすすなわち、増殖を抑制していることが示唆された。

非滅菌海水区でもいずれの微細藻類においても、チオ硫酸ナトリウム濃度依存的に細胞密度が少なくなる傾向にあり、滅菌海水区と同様にチオ硫酸ナトリウムの影響があったものと推察された。また、非滅菌海水区では*P. tricornutum*及び*T. tetrahele*においては 2.5×10^{-3} mol/l以上の区で、*P. lutheri*では 2.5×10^{-5} mol/l以上の区で初期細胞密度を下回っており、増殖の抑制だけでなく、微細藻類のへい死も見られた。

日間増殖率について、*C. neogracile*以外の微細藻類の対照区では、滅菌海水区と非滅菌海水区で日間増殖率の差は見られず、4日間の培養期間では微細藻類の増殖に海水の滅菌の有無が及ぼす影響はほとんどないと考えられる。これらの藻類では、チオ硫酸ナトリウム濃度が増加するとともに、同一濃度での滅菌海水区と非滅菌海水区の差が大きくなる傾向が見られ、その差はチオ硫酸ナトリウム濃度が高いほど大きい傾向が見られる(図3)ことから、これらの藻類で見られた交互作用は相乗作用であると考えられた。以上より、少なくとも*P. tricornutu*、*P. lutheri*及び*T. tetrahele*では、チオ硫酸ナトリウムの影響は、非滅菌海水区でより強くなるものと考えられた。一方、*C. neogracile*の日間増殖率では、対照区において非滅菌海水区が有意に低く、チオ硫酸ナトリウム以外にも培養液中に存在する細菌や原生動物などの影響をより受けている可能性があり滅菌の有無に関する評価は困難であった。

種苗生産現場では、餌料用微細藻類の培養は重要な作業である。比較的大きな規模の藻類培養では、海水の殺菌に、次亜塩素酸ナトリウムによる殺菌が行われ、この

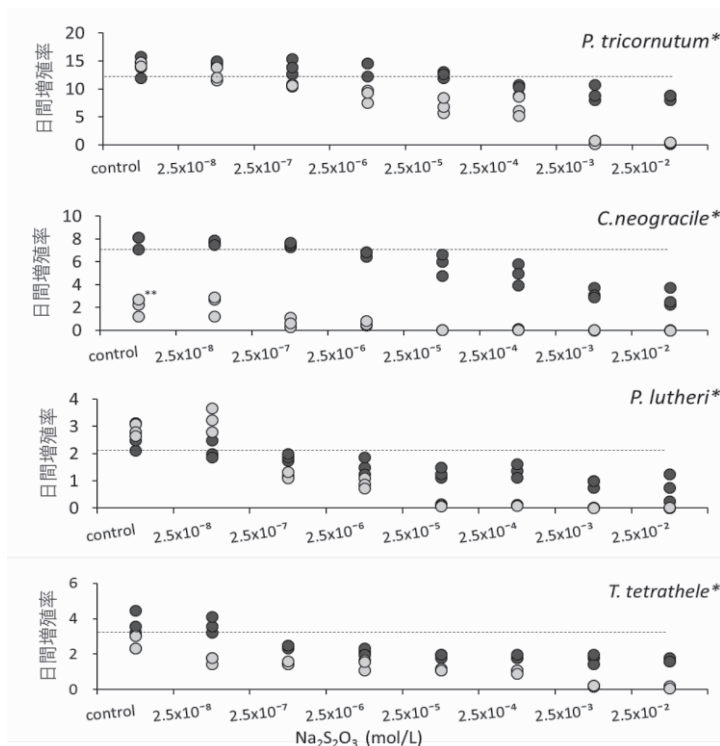


図3 餌料用微細藻類の異なるチオ硫酸ナトリウム ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_8$) 濃度における日間増殖率 ($n=3$)

● : 滅菌海水区, ○ : 非滅菌海水区

破線は滅菌海水区の対照区の下限値を示す。

*チオ硫酸ナトリウム濃度別試験の細胞密度間で有意差あり (ANOVA, $p < 0.01$ (ANOVA)), 滅菌海水区と非滅菌海水区で交互作用あり (two-way ANOVA, $p < 0.05$)。

**対照区において、滅菌海水区と有意差あり (t -test, $p < 0.01$)。

中和にチオ硫酸ナトリウムが用いられる。チオ硫酸ナトリウムにより中和を行った海水で藻類を培養した際に、まれに白濁及び硫化水素臭を伴う培養不調に陥ることがある。本試験では非滅菌海水区の 2.5×10^{-3} mol/l以上の高濃度チオ硫酸ナトリウム添加区で白濁及び硫化水素臭が確認された。これは、培養不調時の現象と類似しており、この培養不調の現象が、高濃度のチオ硫酸ナトリウムを添加したウェル中で再現されたものと考えられる。一部の硫酸還元細菌は嫌気条件下でチオ硫酸ナトリウムから硫化水素を産生することが知られている²⁾。細菌によって形成されるバイオフィーム表面が好気的な環境であれば好気性細菌が、バイオフィーム内部は嫌気性微生物が主に増殖し³⁾、基質が供給される限り増殖を続け一定のバイオマス量に達し、時間の経過とともに細菌の代謝産物は溶液中に溶出する⁴⁾。硫化水素の発生は、非滅菌海水区の中でも高濃度のチオ硫酸ナトリウムを添加した区で確認された反応であることから、海水中の細菌により形成されたウェル表面のバイオフィーム内部の硫酸還元細菌がチオ硫酸イオンを基質とし、硫化水素を発生させたものと推察される。非滅菌海水区の高濃度チオ硫酸ナトリウム添加区で見られたへい死が硫化水素によるものかは定かではないが、少なくとも細菌やバイオフィームが残存する環境で、高濃度のチオ硫酸ナトリウムの添加は、硫化水素を発生させ、培養不調の要因となり得ると推察される。

微細藻類の培養時に発生する不調を避けるための対策としては以下のことが考えられる。まず、バイオフィームは一般的に抗生物質や殺菌剤に対して高い耐性を持っている⁴⁾。このことから、容器の洗浄は物理的、あるいは化学的にバイオフィームを除去あるいは破壊することを念頭においた洗浄を行う必要があるだろう。次に、溶液中に細菌の基質となるチオ硫酸イオンをできるだけ残させないことが重要である。このため、次亜塩素酸ナトリウムの添加は必要最小限とし、さらに添加後一昼夜程度曝気等を行い、ある程度有効塩素濃度を低下させた後に中和することでチオ硫酸ナトリウムの必要量を減らすことができる。残留塩素濃度は水温及び日照条件によっても変わるので、中和にあつては、残留塩素指示薬等を用い最小限のチオ硫酸ナトリウムの使用にとどめることが重要と考えられる。

要 約

- 1) 餌料用微細藻類培養時におけるチオ硫酸ナトリウムの影響を検討した。
- 2) 使用した微細藻類のいずれにおいてもチオ硫酸ナトリウムによる増殖抑制効果が見られた。
- 3) チオ硫酸ナトリウムの影響は、*P. tricorutu*, *P. lutheri*及び*T. tetrathele*で滅菌海水区よりも、非滅菌海水区でより顕著だった。

参考文献

- 1) 今井丈夫監修(1971) 浅海完全養殖, 恒星社厚生閣, 東京
- 2) 藤田雄二, 飯塚昭二, 銭谷武平, (1961) 浅海域の微生物学的研究-5: 夏季内湾底層の貧・無酸素域における硫酸還元細菌ならびに硫黄細菌群の分布について, 長崎大学水産学部研究報告 28 153-160
- 3) 丹波保典(2012)バイオフィームの形成と炭素鋼の腐食, Bull.Soc.Sea.Water Sci. JPN., 66 : 203-208
- 4) バイオフィームの理解・制御から共存へ(2012) Bull.Soc.Sea.Water Sci. JPN., 66 : 191-197