

短 報

吸光光度計を利用した餌料用微細藻培養密度の簡易推定法

川崎琢真・清水洋平・多田匡秀*

Simple method for density measurement of cultured algae applying an absorption spectrometer

Takuma KAWASAKI, Yohei SHIMIZU and Masahide TADA

In the fisheries industry, microalgae are used as aquaculture feed for larval fish and crustaceans and as culture water additives. Methods that use tools such as a counting chamber require a considerable amount of time to determine the density of microalgae as aquaculture feed. The present study thus aimed to develop a method of cell density estimation using a simple absorption spectrometer in six species of microalgae. The absorbance of microalgal cultures showed clear peaks near 430 to 470nm and 680nm, and there's a significant correlation between the algal density and the absorbance at 470nm. No differences were observed between the counting chamber and the absorption spectrometer in cultures of four of the six species, suggesting that the cell density can be effectively estimated using an absorption spectrometer.

キーワード：微細藻類, 餌料, 密度推定, 吸光光度法
2015年9月2日受付, 2016年11月14日受理

微細藻類は、貝類や甲殻類などの無脊椎動物の初期餌料、魚類の飼育水添加剤および餌料生物用の餌として利用されている。特に、二枚貝の種苗生産現場において餌料となる微細藻類の確保は必須であり、生産現場で培養するか、市販の濃縮品を購入して利用するのが一般的である。国内で餌料として用いられる微細藻類は約20種程度(岡内2014)とされており、対象種や育成段階毎に適した種類を用いる必要がある。

水産分野で用いられている微細藻類のうち、汎用的な株は国立研究開発法人水産総合研究センターで保存され、種苗生産機関に配布されている(岡内2011)。餌料用微細藻類のうち、Chaetoceros属やNannochloropsis属の一部は濃縮品が市販されているが、その他の微細藻類を用いる場合には保存株から拡大培養して用いるのが一般的である。

二枚貝の種苗生産において、餌料として用いる微細藻類の量は、飼育水1mL当たりの細胞数を基準として計量される場合が多い。培養した微細藻類の密度の決定は、目視による計数法として血球計算盤を用いる方法(中島・

奥村2000, 加藤ら2004, 杉山ら2013)およびUtermohl法(Hasle1978, 勢村1995, 原口・谷口2003)などが、機器による計測法としてクロロフィル計を用いる方法(山崎・疋田2013)およびコールターカウンターを用いる方法(石川・磯和2012)などが報告されている。これらの方法の中で、目視による計数法は大量の種苗生産時には手間がかかること、計数に用いられる機器は一般に高額で限られた機関でしか利用できないことが課題である。

吸光光度法は、溶液中の溶解物又は懸濁物の定量法として、研究分野で広く利用されている。対象とする試料は化合物の他、生体物質にも有効であり、核酸、イムノグロブリン、細胞数および大腸菌数などの汎用的な測定対象については、機器毎に自動濃度計算が可能なソフトウェアを内蔵する機器も増えて来ている。西澤・千原(1979)は、藻体懸濁液について吸光度と藻体濃度の関係から検量線を作成することで定量が可能であると提案しているが、これまで種苗生産の現場で餌料として用いる培養微細藻類の濃度管理に利用された例は示されてい

* 地方独立行政法人北海道立総合研究機構栽培水産試験場 〒051-0013 北海道室蘭市舟見町156番3号
Mariculture Fisheries Research Institute, Hokkaido Reserch Organization, Hunami 156-3, Muroran, Hokkaido 051-0013, Japan
kawasaki-takuma@hro.or.jp

ない。

そこで本研究では、水産分野で培養して利用される微細藻類6種を対象に、小型の吸光度計を用いて細胞密度を簡易に推定する方法の開発を試みた。

材料と方法

試験に用いた微細藻類は、国立研究開発法人水産総合研究センター増養殖研究所および瀬戸内海区水産研究所より元株の配布を受けたものを拡大培養して使用した(表1)。培養液は全ての種で共通とし、120℃で20分の高圧蒸気滅菌を施した濾過海水1Lに対し、市販培養液(KW21 第一製網)1mL、50g/Lメタケイ酸ナトリウム水溶液1mLの割合で添加した。微細藻類の元株を添加した培養液を容量1リットルの培養袋(エニーロック3号セット BC-AL03SET 株式会社バイオメディカルサイエンス)とエアレーションを用いて20℃で通気培養した。培養した微細藻類は、対数増殖期に達した段階で培養を停止し、各試験に供した。

本試験で対象とする6種の微細藻類の吸光特性を調べるため、各種微細藻類の培養液2mLを光路長10mmのディスポーザブルセル(ディスポセル2711 ケニス株式会社)に入れ、紫外・可視分光光度計(DU730 ベックマンコールター株式会社)で400~900nmの範囲の吸光度を5nm毎に測定した。

培養微細藻類の密度と吸光度の関係を調べる為、6種の微細藻類を各種3又は4本の培養袋で培養を行った。微細藻類培養液を、トーマ血球計算盤(03-101-1 エルマ販売株式会社)を用いて生物顕微鏡(Nikon Eclipse 80i)下で培養袋毎に6回計数して平均値を求めた。続いて、計数済みの微細藻類培養液を未使用の滅菌培養液で1/2希釈を繰り返しながら、単波長吸光度計(吸光度計B ABS-B470 株式会社共立理化学研究所)で470nmの吸光度を測定した。測定容器は光路長20mmの専用カップ(WAK-CC10 株式会社共立理化学研究所)を用いた。次に、微細藻類の細胞密度と吸光度計により測定した吸光度から散布図を描画し、近似式を計算して標準曲線とした。また、細胞密度と吸光度の関係を回帰分析により解析した。さらに、得られた標準曲線を用いて、簡易吸光度計の検出範囲で推定できる細胞密度の範囲を求めた。

表1. 試験に用いた微細藻類の種類と株名

| グループ | 種名 | 株名 |
|--------|----------------------------------|-----------|
| 珪藻類 | <i>Chaetoceros neogracile</i> | NR1A-0023 |
| 珪藻類 | <i>Phaeodactylum tricornutum</i> | NR1A-0065 |
| ハプト藻類 | <i>Pavlova lutheri</i> | NR1A-0080 |
| ハプト藻類 | <i>Isochrysis sp. (Tahiti)</i> | NR1A-0076 |
| ブラシノ藻類 | <i>Tetraselmis tetrahele</i> | NR1A-0090 |
| 真正眼点藻類 | <i>Nannochloropsis oculata</i> | NR1A-0098 |

吸光度計での細胞密度推定の有効性を検証するため、3種類の異なる容器(A, B, C)で培養した6種各3本の微細藻類培養液を用い、血球計算盤を用いる方法および吸光度計の測定値を標準曲線に当てはめる方法でそれぞれの細胞密度を求めた2つの異なる方法により得られた細胞密度の平均値をt検定により比較した。

本研究において使用した回帰分析およびt検定はすべてStatcel3ソフトウェア(柳井2013)を用いて解析した。

結 果

異なる6種の微細藻類培養液を用いて400~900nm(5nm間隔)での吸光度を測定した結果、すべての種で430~470nm付近と680nm付近に顕著な吸光度のピークが見られた。このうち、珪藻類である*Chaetoceros neogracile*と*Phaeodactylum tricornutum*は440nm付近でのピークが680nm付近のピークに比べ高かった。その他4種では、430~470nm付近と680nm付近のピークの高さは同程度であった。

微細藻類6種の培養液の細胞密度と470nmでの吸光度の関係から散布図を描いた結果、すべての株で細胞密度と吸光度の間に有意な正の相関が見られた(図1)。また、線形近似により得た近似式は、全ての種でR²の値が0.96以上であった。簡易吸光度計の検出範囲である吸光度0.05~1.50の範囲において検出可能な細胞密度を標準曲線の式から求めた結果、*C. neogracile*ではおよそ40万~750万細胞/mL、*P. tricornutum*ではおよそ20万~880万細胞/mL、*Pavlova lutheri*ではおよそ30万~710万細胞/mL、*Isochrysis sp. (Tahiti)*ではおよそ30万~1000万細胞/mL、*Tetraselmis tetrahele*ではおよそ4万~220万細胞/mL、*Nannochloropsis oculata*ではおよそ80万~2200万細胞/mL程度の範囲と推定された。

血球計算盤と吸光度計により細胞密度を求めて平均値を比較したところ、*C. neogracile*、*P. lutheri*、*T. tetrahele*および*N. oculata*では2つの方法で求めた細胞密度の平均値に有意な差は見られなかった。*P. tricornutum*では3本の培養液の内2本で、血球計算盤に比べ吸光度計で求めた細胞密度が有意に高い値を示した。*I. sp. (Tahiti)*では3本の培養液のうち2本で血球計算盤に比べ吸光度計で求めた細胞密度が有意に低い値を示した。また、全ての株において血球計算盤に比べ吸光度計で推定した場合の方が結果のばらつきが小さくなる傾向が見られた(図2)。

考 察

本研究において、微細藻類6種の400~900nmにおける吸光特性を調べた結果、種共通で430~470nm付近と680nm付近に顕著な吸光度のピークが見られた。すべての光合成植物が持つクロロフィルaの吸収極大波

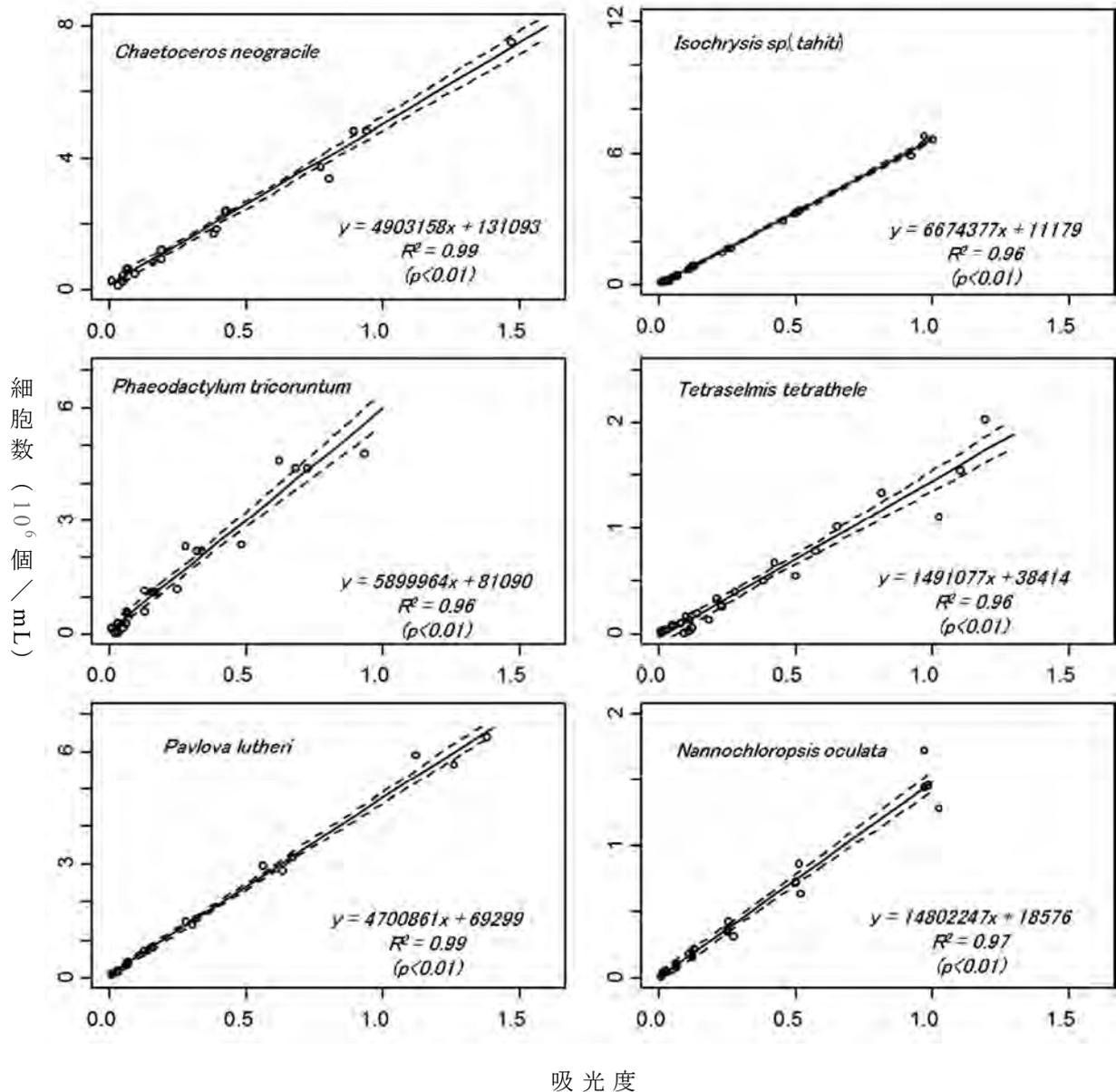


図1. 微細藻類6種の細胞密度と吸光度の関係
点線は95%信頼区間を示す

長は430nm付近と679nm付近(植木ら2010)であり、本研究で見られた680nm付近の吸光度のピークはクロロフィルa由来と推察された。また、光合成生物が持つカロテノイドには多くの種類が存在し、珪藻およびハプト藻ではフコキサンチン(吸収極大波長449nm)、真正眼点藻類ではビオラキサンチン(吸収極大波長441nm)が主成分と報告されている(高市2009)。本研究で見られた430~470nm付近のピークは種を問わずなだらかであったことから、複数種のカロテノイドおよび前述のクロロフィルaの吸光特性が混在した状態での吸光スペクトルである可能性が高い。本研究で用いた470nmの吸光度は、微細藻類の持つクロロフィルaおよびカロテノイド類の吸光度をターゲットとした測定を実施したと考えられる。

本研究で調べた細胞密度と吸光度との関係から、餌料

用微細藻類培養液中の細胞密度を吸光度測定により推定できる可能性が示された。試験に用いた6種の微細藻類のうち、*C. neogracile*、*P. lutheri*、*T. tetrathele*、および*N. oculata*では、吸光度計と血球計算盤で同等の結果が得られた。*P. tricornutum*では、血球計算盤に比べ吸光度計を用いた場合に細胞密度が高く、*I. sp. (Tahiti)*では逆に吸光度計による推定値が低くなる傾向が見られた。これら2種で推定が困難な原因の1つとして、培養液中に生じた微細藻類のフロックが計数または吸光度計の結果に影響を及ぼしたと考えられるが、違いが生じた理由は不明である。さらに、本試験で用いた6種の微細藻類では、測定可能な細胞密度の範囲が大きく異なることが明らかとなった。この原因を本研究で明らかとすることはできないが、細胞の小さな*N. oculata*が最も高密度まで推定でき、それに比べ細胞の大きな*P. tricornutum*では

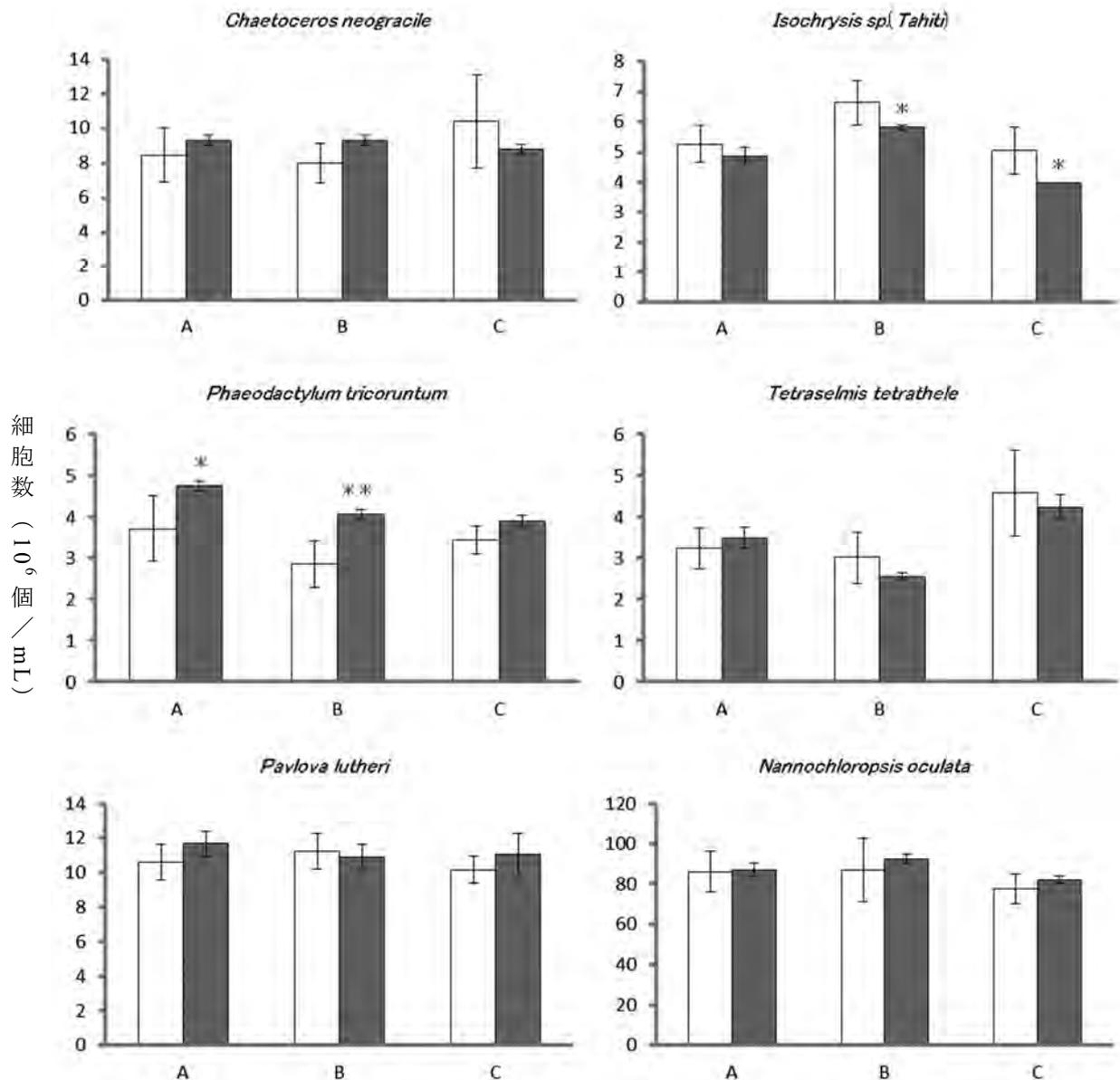


図 2. 血球計算盤 (白) と吸光度 (灰) から算出した細胞密度の比較
 A から C は各株を異なる容器で培養した培養液を示す。白色のバーは血球計算盤で求めた細胞密度 ($N = 6$) を、灰色のバーは吸光度計で求めた細胞密度 ($N = 3$) を示す。バーの上部の縦棒は標準偏差を表す。* 及び ** は有意差があることを示す (* ウェルチ t 検定 ($p < 0.05$), ** スチューデント t 検定 ($p < 0.01$))

推定できる密度が低かったことから、細胞の大きさや含まれる色素量が関係していると推察される。

本研究により試みた単波長吸光度計による細胞密度の推定方法は、一度標準曲線を描いて各吸光度から細胞密度の変換表を作成しておけば、血球計算盤で測定する方法に比べ、手早く密度を決定することが可能である。二枚貝等の浮遊幼生飼育試験において、自家培養した微細藻類を給餌する場合などには、給餌条件を揃えるために培養液中の細胞密度の計数が必要となる場合がある。このように頻りに計数が必要となる場面において、吸光度計による細胞密度推定は作業の軽量化に非常に有効な手段となりうる。一方、微細藻類の培養では、増殖段階毎に細胞の様相が変化することが報告されている (岡

内 2014)。本研究で用いたのは対数増殖期の培養液であり、定常期や死滅期の培養細胞や濃縮細胞およびそれらの日周期性など様々な条件の培養液の密度推定には、別途有効性の確認が必要である。

以上の結果より、餌料用微細藻類の培養液の細胞密度の管理において、*C. neogracile*, *P. lutheri*, *T. tetraathele* および *N. oculata* の 4 種の微細藻類においては簡易吸光度計を用いた迅速な計測ができる可能性が示された。この方法は、自家培養を要する餌料用微細藻類の密度測定作業を大幅に軽量化できる可能性がある。また本方法に用いた簡易吸光度計は小型・安価で乾電池で利用できることから、種苗生産現場等への普及も容易な機器である。ただし、本研究で用いている標準曲線は普遍的なもので

は無いと考えられるため、利用機関毎に標準化の実施と定期的な精度確認が必要である。

謝 辞

本研究を遂行するに当たり、微細藻類を配布していただいた国立研究開発法人水産総合研究センター増養殖研究所の岡内正典氏および瀬戸内海区水産研究所の兼松正衛氏にお礼申し上げます。また、本研究におけるデータ分析に関し、包括的な助言を頂いた北海道立総合研究機構栽培水産試験場の石田良太郎氏、城幹昌氏に深く感謝する。

引用文献

- 1) Hasle G R (1978) Using the inverted microscope. in Phytoplankton manual, ed. by A. Sourin, Monographs on Oceanographic Methodology, Vol.6, UNESCO, Paris, 88, 191-196.
- 2) 原口浩一・谷口 旭 (2003) 脱りんスラグおよび都市排水同時添加が植物プランクトン群集の増殖と種組成に及ぼす効果. 鉄と鋼, **89** (4), 50-57.
- 3) 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.
- 4) 加藤元一・岡内正典・中神秀一 (2004) 珪藻類キートセロス属2種の濃縮技術の開発と濃縮細胞の再生. 水産増殖, **52** (3), 231-237.
- 5) 中島幹二・奥村裕弥 (2000) 人工光利用による餌料用微小藻類 *Pavlova lutheri* の培養器大型化に関する考察. 照明学会誌, **84** (8A), 502-506.
- 6) 西澤一俊・千原光雄 (1979) 藻類研究法. 共立出版, 東京, 278-280p.
- 7) 岡内正典 (2011) 餌料となる微細藻類の培養を簡単に!. 養殖, **611**, 50-53.
- 8) 岡内正典 (2014) 餌料用微細藻類の高増殖株作出とその培養法および利用. 日本水産学会誌, **80** (3), 323-326.
- 9) 勢村 均 (1995) イタヤガイ成貝における餌料プランクトンの種および濃度と濾水速度, 消化率, 同化速度との関係. 日本水産学会誌, **61** (5), 673-678.
- 10) 杉山勇作・上野幹憲・Cyril Glenn Perez SATUITO・山下憲司・山口健一・小田達也 (2013) 微細藻類 *Parachlorella kessleri* KNK-A001 株乾燥粉末のマガキ稚貝及びシオミズツボウムシに対する餌料としての有用性の検討. 水産増殖, **61**, 389-394.
- 11) 高市真一 (2009) カロテノイドの分析. 低温化学, **67**, p. 347-353.
- 12) 植木知佳・村上明男・加藤敏明・嵯峨直恆・本村泰三 (2010) 紅藻スサビノリの光合成色素と葉緑体微細構造における栄養欠乏応答. 日本水産学会誌, **76**, 375-382.
- 13) 山崎康裕・疋田拓也 (2013) 珪藻類キートセロス *Chaetoceros neogracile* の培養液を用いた餌料用微細藻類パブロバ *Pavlova lutheri* の増殖改善. 日本水産学会誌, **79**, 875-877.
- 14) 柳井久江 (2013) 4step エクセル統計. オーエムエス出版, 埼玉, 1-293p.