ノリの培養用人工海水、炭酸ガス給源に関する検討

今田 克, 斉藤 祐一

(1986年1月8日受理)

Studies of Artificial Seawater and Carbon Dioxide Source for
Indoor *Porphyra* Cultivation

Osamu Imada* and Yuichi Saito*

The composition of artificial seawater and the carbon dioxide source were investigated by the culture test of laver thalli. Culture test results were as follows.

1. About the screening of more suitable masking agents for the trace metal solution (P1 sol.) in place of ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), four chelaters diethylenetriaminepentaacetic acid (DTPA), 1,2-cyclohexanediaminetetraacetic acid (CDTA), *N*-hydroxyethylenediamine-*N*'-*N*''-triacetic acid (HEEDTA) and nitrilotriacetic acid (NTA) were examined. The two former salts, DTPA and CDTA had approximately the same and the two latter salts, HEEDTA and NTA had somewhat less influence than EDTA on the growth rate of laver thalli.
2. The adding volume change and the changing of the ratio of chelater and heavy metal salts of P1 sol. were investigated based on modified ASP 6 culture medium after Suto. Adding of P1 sol. was examined by six steps of the volume ratio (0, $\times 0.5$, $\times 1$, $\times 2$, $\times 5$, $\times 10$). Two levels ($\times 1$, $\times 2$) were selected as suitable for laver culture. The ratio of chelater and heavy metal salts were examined by six steps of the ratio (0/1, 0.3/1, 0.75/1, 1.5/1, 5/1, 10/1), and three ratio levels (0.75/1, 1.5/1, 5/1) were selected as suitable about laver culture. The adding volume change and the changing of the ratio of chelater and heavy metal salts of P1 sol. were not so serious for the thalli culture but obvious decrease of the germination of conchospore were recognized.
3. All appearances indicate that there are no negative effects, using NaCl and MgSO₄ salts of the industrial grade in place of the agent grade for artificial seawater as shown by the culture test of laver.
4. The culture tests of laver thalli using the combustion vent gas from the boiler burning A class heavy oil in place of pure gasified liquid CO₂ were investigated. The combustion vent gas was more suitable than pure CO₂ for the culture of laver, having an additional sterilizing function caused by the sulfur dioxide present in it.

ノリの人工培養用海水としては天然海水、人工海水のいずれかが用いられ、須藤はそれぞれについて改良手法を示している。著者は²⁾天然海水について更に検討し、季節的に特性が変化することを報告し、海底砂泥よりもたらされる成分にその原因があると推測した。一方で人工海水は比較的安定した培養成績を示すが、製造に人手を要し、薬品代も高価であるので長期間の使用や、使用薬剤の等級を安価なものにする等の工夫が求められる。人工海水の組成は、例えば Provasoli の ASP 6 須藤改良法は Table 1 に示す通りで、基本はナトリウム、マグネシウム、カリウム、カルシウムの主成分塩類、栄養塩 (N, P) 及び微量元素 (P 1 sol.) の 3 部である。栄養塩は補足的に経時的に添加されるが、微量元素は重

金属イオンを定常的に一定レベルで保持するため海水調製時に添加される。微量元素は重金属塩とマスキング剤で構成され、エチレンジアミン四酢酸 (EDTA) のような強力なマスキング剤の利用が人工海水の成績の安定に大きく寄与していると思われる。しかしマスキング剤の種類、重金属塩との量比、更には微量成分の人工海水への添加量など細かい点では未だに検討すべき点があり、主成分塩類の等級、夾雑塩類とも交絡して培養液中での経時的消長や、バランスが問われるところである。大型槽での培養を検討する際には経済面からも工業用塩の使用は当然考えねばならないが、夾雑塩類の影響を防ぐためにも微量元素の制御は配慮せねばならない問題である。因みに人工海水のコストは人工培養試験原料費の

* 協和醸酵工業 (株) (Kyowa Hakko Kogyo Co. Ltd., 1-6-1 Ohtemachi, Chiyoda, Tokyo 100, Japan).

八割以上を占めており、試薬一級と工業用塩とでは価格的に 10 倍以上の値差がある。

そこで人工海水の組成、殊に微量元素の検討をフラスコ試験で行なうと共に、工業用塩使用の可否を併せてノリ葉体を用いた培養試験を行なって確かめた。

一方、ノリ葉体の培養において光合成炭素給源として用いる炭酸ガスに就いても、実験室用には専らボンベ詰めの液化炭酸が気化使用されるが、偶々培養中に赤ぐされ病に罹病した葉体があり、これにチオ硫酸ナトリウムが有効で、蔓延を阻止した例があり、その効果が亜硫酸塩に由来するものではないかとの知見があったので、バイラー廃ガスを炭酸ガス及び亜硫酸ガスの給源として活用することを試みた。このことは当然ながら炭酸ガスのコスト引下げと、一石二鳥の効果を期待した試みである。これらをまとめて以下に報告する。

実験方法及び材料

マスキング剤 常用されているマスキング剤のエチレンジアミン 4 酢酸 (EDTA) の外にジエチレントリアミノ 5 酢酸 (DTPA)、ニトリロ 3 酢酸 (NTA)、2 シクロヘキサンジアミン 4 酢酸 (CDTA)、*N* ヒドロキシルエチレンジアミン *N*-*N'*-*N''* 3 酢酸 (HEEDTA) を試験に供した。試験は Table 1 に示した人工海水 ASP 6 須藤改良法に用いる P 1 sol. 中のキレート剤の EDTA・Na₂ をそれぞれ上記薬品に置きかえ、EDTA・Na₂ が 7.5 ppm の濃度であるので、3 分の 1 の 2.5 ppm 及び 1.5

Table 1. Composition of artificial seawater ASP 6

Salt	Weight (g)
NaCl	24
MgSO ₄ ·7H ₂ O	8
KCl	0.7
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0.37
NaNO ₃	0.2
Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O	0.025
P1 sol.	1-10 (ml)
Water	1000 (ml)

倍の 11.3 ppm の 3 段階の濃度でノリ葉体の培養比較を行なった。各マスキング剤の一般性状は Table 2 に示す通りである。⁶⁾

P 1 sol. Table 1 に示した人工海水において微量元素溶液 (P 1 sol.) の添加量は海水 1 l に対して 1~10 ml となっており、適宜加減することにしてある。また P 1 sol. 中のマスキング剤と重金属塩とのモル比を須藤は 2/1 としている。(分子がマスキング剤、分母が重金属塩著者らは標準のモル比を 1.5/1 に規定したが、Table 3 に今回の試験の基本組成と参考のため既往文献の組成を示す。P 1 sol. の試験ではこの基本組成のものを 1 として、添加量比 0, 0.5, 1, 2, 5, 10 の区を設け、またこの基本組成におけるマスキング剤と重金属塩比 1.5/1 に対し 0/1, 0.3/1, 0.75/1, 1.5/1, 5/1, 10/1 の 6 区を設けて試験を行なった。更に追試として添加量比 0, 5, 10 の 3 区、マスキング剤と重金属塩比 0/1, 5/1, 10/1 の 3 区を

Table 2. Tested masking agents for artificial seawater used laver culture

Masking agent	Mol. weight	No. of COOH	Acid dissociation const.			
			pK ₁	pK ₂	pK ₃	pK ₄
Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA Na ₂)	292	4	1.99	2.67	6.16	10.26
Diethylenetriaminepentaacetic acid (DTPA)	393	5			—	
Nitrilotriacetic acid (NTA)	191	3	1.89	2.49	9.73	—
1',2-Cyclohexanediaminetetraacetic acid (CDTA)	346	4	2.43	3.52	6.12	11.7
<i>N</i> -Hydroxyethylenediamine- <i>N</i> - <i>N'</i> - <i>N''</i> -triacetic acid (HEEDTA)	278	3	2.64	5.33	9.73	—

Masking agent	log K _{MA}						
	Fe ²⁺	Fe ³⁺	Co ²⁺	Cu ²⁺	Ni ²⁺	Zn ²⁺	Mn ²⁺
Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA Na ₂)	14.33	25.1	16.31	18.80	18.62	16.50	14.04
Diethylenetriaminepentaacetic acid (DTPA)				—			
Nitrilotriacetic acid (NTA)	8.84	15.87	10.38	12.96	11.53	10.67	7.44
1',2-Cyclohexanediaminetetraacetic acid (CDTA)	16.27	27.48	18.92	21.30	19.4	18.68	16.78
<i>N</i> -Hydroxyethylenediamine- <i>N</i> - <i>N'</i> - <i>N''</i> -triacetic acid (HEEDTA)	11.6	19.8	14.40	17.55	17.0	14.5	10.7

Table 3. Composition of masking metal salts solution of artificial seawater (PI sol.)

	Tested component of masking metals salts sol.		Reference components of PI sol.					
	as salt (ppm)	as metal (ppm)	as salt (ppm)	as metal (ppm)	as salt (ppm)	as metal (ppm)	as salt (ppm)	as metal (ppm)
EDTA·2Na·2H ₂ O	7.6	—	3.0	—	2.0	—	6.0	—
FeSO ₄ ·7H ₂ O	2.0	0.4		0.08	0.8	0.16		0.08
MnSO ₄ ·nH ₂ O (n=4~6)	0.8	0.23		0.12	0.32	0.09		0.12
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.4	0.16		—	0.16	0.06t		0.05
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0.2	0.046		0.015	0.08	0.018		0.015
CoSO ₄ ·7H ₂ O	0.08	0.017		0.003	0.032	0.007		0.003
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.02	0.005		0.0012	0.008	0.002		0.0012
Mol. Ratio of EDTA/METALS		1.5/1		2/1		1/1		4/1

*1 Sudo: The Aquiculture 7(3) 7-11 (1960).

*2 Teramoto: The Japanese Journal of Phycology 17(1) 29-33 (1969).

Table 4. Standard composition and trace metal contents of industrial use grade salt

Components	Special grade (%)	Regular grade (%)	Trace minerals	Contents	
				ppm	×10 ⁻³ μmol
NaCl	99.72	99.69	Al	3.3	—
Na ₂ SO ₄	0.054	0.065	Cr	0.013	0.25
KCl	0.031	0.032	Cu	0.17	2.7
CaSO ₄	0.054	0.065	Pb	0.12	0.58
MgSO ₄	0.020	0.025	Ti	0.09	1.9
MgCl ₂	—	t	V	0.03	0.59
Insol. in water	0.008	0.008	Zn	0.32	4.9
Moisture	0.074	0.077	not detected Metals	Co, Fe, Mn, Mo, Ni	
Total	99.96	99.96	Total of heavy Metals	—	10.9

基本組成と対比試験し、培養途中の経過を海水中の鉄の消長をサンプリング分析によって確認した。鉄を重金属塩の指標とした理由は微量要素の中でもっとも量が多く分析も比較的容易だからである。鉄の分析はバソフェンクロリン発色による比色定量法を用いた。試験は各処方の海水を用い、ノリ葉体または幼芽を培養し、成長の良否、葉体の性状を比較検討した。

工業用塩 人工海水の成分は Table 1 に示すように食塩と硫酸マグネシウムが量的にもっとも大で合算すると塩類総重量の 95% に達する。したがってこの二成分を工業用とすれば製造コストはほとんど軽減できるので、原料を試薬 1 級のものと対比する培養試験を行なった。

工業用塩としては食塩に赤穂製塩(株)、内海塩業(株)、の二社、硫酸マグネシウムは 7 水塩のもので、日本化学塩業(株)、内海塩業(株)の二社のものを選んだ。食塩は 20 kg、硫酸マグネシウムは 30 kg クラフト紙袋詰めである。一方試薬 1 級の対照区には松永化学工業(株)の食塩、純正化学(株)の硫酸マグネシウムを用いた。なお工

業用精製塩の一般的性状を Table 4 に示した。

炭酸ガス給源 供試したボイラー廃ガスは A 重油専焼の煙管式ボイラーの煙道ガスで煙道出口より圧縮機でレシーバーに受入れ、これをビニール管で実験室に導き、簡単な汜過器、流量計を介して流量を調節し培養通気中に添加した。廃ガス中の炭酸ガス及び亜硫酸ガスはオルザット法ガス吸収分析器、北川氏ガス検知管により、それぞれ分析した。炭酸ガスは 6.0~12.0%、亜硫酸ガスは 300~1500 ppm 含まれており、残余は酸素、窒素等である。なお通気中への添加量は炭酸ガス濃度を指標として規定した。

ノリ葉体の培養 各種試験培養に供したノリ葉体はアサカサノリまたはスサビノリで、胞子着生直後のものから、幼芽期、成葉期のものを適宜選んで使用した。培養温度は大略 15°C、照明は人工照明で蛍光灯を主に用い、型大槽では高圧水銀灯を使用し、照度は 5500 lx から 10000 lx までとし明期は大体 8 時間とした。培養容器は 650 ml の丸底フラスコ、2 l の円筒槽などを選別使用した。これら一連の試験条件をまとめて Table 5 に表

Table 5. Culture test conditions for *Porphyra* thalli

Test item	Culture temp. (°C)	Lighting condition (lx × h/day)	Culture period (days) (Int.-Final)	Basal culture medium & [substrata for] germlings	Aeration (ml/min)	Culture density (g. pieces/ml vessel) (ml)	Strain (Prefect.)
Masking agent selection (germlings)	15~17	10000 × 8	52 (1-52)	ASP-6 except masking agent [kiesel guhr powder]	1000~1500	(max) 2.5 g/650 R. F.*1	yezoensis (Iwate)
P. 1 solution adding (thalli)	15 ± 2	8000 × 8 10000 × 8	15 (47-61) 10 (29-38)	ASP-6 except P. 1 solution	500 1500	0.04~1.5 g/650 R. F. 0.5~7~9 g/2000 cyl.**2	tenera (Hiroshima) tenera (Fukuoka)
P. 1 solution masking agents and metals ratio (thalli)	15 ± 2	8000 × 8 10000 × 8	15 (47-61) 10 (29-38)	ASP-6 except P. 1 solution	500 1500	0.04~1.5 g/650 R. F. 0.5~7~9 g/2000 cyl.	tenera (Hiroshima) tenera (Fukuoka)
P. 1 solution volume & ratio (germlings)	15 ± 2	10000 × 8	28 (1-28)	ASP-6 exceSt P. 1 solution kiesel guhr powder	1500	(max) 8000 P/2000 cyl.	tenera (Chiba)
Industrial grade salts using (thalli)	15 ± 2	5500 × 12	6 (39-45)	ASP-6 industrial & agent grade	500	20 P/650 R. F.	yezoensis (Iwate)
Waste gas using I (thalli)	15 ± 2	7000 × 9	10 (37-46)	ASP-6	3000	15 P/4000 R. F.	yezoensis (Iwate)
Waste gas using II (thalli)	11~13	8000 × 8	8 (54-62)	ASP-6	1500	1-2 g/2000 cyl.	tenera (Fukuoka)
Waste gas using III (thalli)	11~13	6000 × 8	13 (48-61)	ASP-6	1500~10000	1-2 g/2000 cyl. 60~80 g/12000 cyl.	tenera (Okayama)

*1: Round flask equipped air nozzle at bottom of flask.

*2: Cylinder type culture vessel.

Table 6. Culture test of *Porphyra thalli* for comparing of chelated substances used for P1 sol. of artificial seawater

Chelator	Concentration (mmol $\times 10^{-3}$)	Culture result		
		Daily growth rate (%/day) 45-52 days	Max size (52 days) (length $\times$ width m/m)	Color
DTPA	2.5 (31.8)	8.7	—	—
	7.5 (95.4)	20.0	28 $\times$ 18	reddish
	11.5 (143.8)	25.5	47 $\times$ 22	normal
NTA	2.5 (39.2)	—	—	—
	7.5 (117.0)	8.0	—	—
	11.5 (177.4)	12.6	25 $\times$ 15	reddish
CDTA	2.5 (28.9)	—	—	—
	7.5 (86.7)	14.0	30 $\times$ 17	normal
	11.5 (130.6)	18.4	47 $\times$ 22	normal
HEEDTA	2.5	2.1	—	—
	7.5	17.8	28 $\times$ 13	reddish
	11.5	17.1	22 $\times$ 13	reddish
EDTA (cont.)	7.5 (20.2)	16.3	30 $\times$ 17	normal

Table 7. Test results of modified artificial seawater ASP 6 varying of added volume of P1 sol.

No.	Added P1 sol. volume ratio to standard*	Daily growth rate of thalli (%/day)	Properties of cultured thalli	
			Color	Thickness
1	$\times 0$	22.4	reddish black	thin
2	$\times 0.5$	23.7	slightly reddish black	thin
3	standard*	23.2	black	normal
4	$\times 2$	23.2	black	normal
5	$\times 5$	22.7	black	thick
6	$\times 10$	21.6	black	thick

The results were average of 3 flask per each.

* Standard artificial seawater 1 l contains EDTA $\text{Na} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 7.6 mg, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 2.0 mg (0.4 as Fe^{++}), $\text{MnSO}_4 \cdot 4 \sim 6\text{H}_2\text{O}$ 0.8 mg (0.23 Mn^{++}), $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.4 mg (0.16 as Mo^{++}), $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2 mg (0.046 as Zn^{++}), $\text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.08 mg (0.017 as Co^{++}), $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.02 mg (0.005 as Cu^{++}).

示した。

結 果

マスティング剤 人工海水中の微量元素 (P1 sol.) に用いるマスティング剤として EDTA に代えて DTPA, NTA, CDTA, HEEDTA を用い、ノリ葉体の培養を行なった。その試験結果を Table 6 に示した。表では各マスティング剤を用いた海水でのノリ幼芽の生育を胞子着生から培養した中で葉令 45 日から 52 日までの日生長率 (%/day) と、52 日目の葉体の寸法、色彩で表示した。結果はいずれのマスティング剤を用いてもノリ幼芽の生育は可能であったが、生育状況より判断すると、DTPA, CDTA は EDTA とほぼ同格かやや優れており、HEEDTA と NTA はやや劣った。特に葉体の色調は NTA, HEEDTA の二区で赤味が強く弱々しかった。

ただこの試験は小型のフラスコ試験で、かなり夾雑藻

による汚染が認められたので、それらの影響を考慮する必要があるものと思われる。

P1 sol. マスティング剤の選抜試験と同様に人工海水の微量元素 P1 sol. についてもノリ葉体及び幼芽を用いて培養試験を行ない、添加量、マスティング剤/重金属塩比について検討した。即ち基本組成を中心にそれぞれ 6 段階の濃度、量比をとって試験し、更にその中から 8 段階を追試した。これらの結果を Table 7, Table 8, Table 9, Table 10, に示した。Table 7 は P1 sol. の添加量の試験で Table 8 は量比の試験である。Table 7 でわかる通り、添加量は基本組成乃至 2 倍が良く、量を増すと葉体は厚目となり、量を減少すると薄目になること、またそれに伴って色調も量を増すと黒味が強くなり、量を減ざると赤味がかってくることが認められる。Table 8 では量比を 0/1 から 10/1 まで変えて試験を行なったが、量比の影響はさほど顕著ではなく、基本組成の半分

Table 8. Test results of modified artificial seawater ASP 6 varying in ratio of chelater (EDTA) and heavy metal salts

No.	EDTA (mmol)/ (mmol) Metals	Daily growth rate of thalli (%/day)	Properties of cultured thalli	
			color	thickness
1	0/1	21.8	reddish	normal
2	0.3/1	22.4	black	normal
3	0.75/1	21.2	black	normal
4	1.5/1	21.5	black	normal
5	5/1	21.3	black	normal
6	10/1	20.1	black	normal

Test results were average of 3 flasks.

Table 9. Cultured test of *Porphyra* thalli using of artificial seawater ASP 6 varying added volume of P1 sol. and a ratio of chelater to heavy metal salts in them

No.	Added P1 sol. vol ratio to standard	EDTA (mmol)/ (mmol) Metal	Daily growth rate (%/day)	Properties of thalli		Content of Fe (ppm) in cultured seawater	
				color	thickness	initial	final
1	0	(—)	32.6	reddish	thin	0.3	0.3
4	3	1/1	32.6	normal	normal	7.2	2.7
3	5	1/1	30.8	normal	thick	12.2	2.6
4	1	0/1	30.1	reddish	normal	1.4	0.3
5	1	5/1	31.7	normal	normal	1.1	0.5
6	1	10/1	33.2	normal	normal	1.1	0.5
(control)	1	1/1	32.6	normal	normal	1.1	0.3

Standard artificial seawater 1 l contains EDTA $\text{Na}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 5.0 mg and same mg of salts shown in Table 7.

Table 10. Culture test of *Porphyra* germling using artificial sea water ASP 6 varying added volume of P 1 solution and a ratio of chelater to heavy metal salts in them

Test	Added P1 sol. volume ratio to standard	Ratio of chelater to heavy metal salts	Culture test results				Fe content in seawater [exchanging the seawater after 7 days each]		
			No. of grown germlings	Size, length $\times$ width (m/m)	Color of germling	Shape of germling	Initial	21 days	28 days
1	1	1:1	693	1.5 $\times$ 0.5	normal	normal	1.6	1.4	1.1
2	0	14 (—)	35	2.0 $\times$ 1.0	reddish	normal	0.6	0.4	0.4
3	5	1:1	8100	4.5 $\times$ 0.5	normal	excellent	5.9	5.0	4.3
4	10	1:1	312	1.5 $\times$ 0.5	normal	normal	10.7	10.4	8.8
5	1	1:0	58	1.5 $\times$ 0.5	normal	normal	0.6	0.4	0.4
6	1	1:5	1431	3.5 $\times$ 0.7	normal	normal	2.4	2.1	1.8
7	1	1:10	4200	2.0 $\times$ 1.0	normal	normal	2.3	2.3	1.7

から倍以下までの間では有意な差は認められなかった。しかしマスキング剤無添加区や 10 倍区では共に生長がやや低下し、葉体も不健全さが目立った。しかしその程度は予想したよりも軽度であった。Table 9 は確認のための追試で 2 l 槽を用い多量の葉体で培養密度を高めて比較した試験である。この試験では併せて鉄の消長を培養前と培養後の海水を分析して調べた。結果は添加量の影響も、量比の試験もいずれも Table 7, Table 8 の傾向を裏づけており、葉体の生育は日生長率では差が無い。得られた葉体の状況から判断すると P 1 sol. の多

い方が良く、無添加では葉体が薄く不健全となった。量比をかえた試験では顕著な差は認められなかった。ただ鉄分の消長をみると対照の基本組成区では培養後の鉄分残存量は無添加区と同じ濃度まで下がっており、これに対して倍、5 倍、10 区は余裕のある濃度を示している。しかし鉄分の消費量は明らかに 5 倍、10 倍添加区は対照区よりも多く、得られた製品に影響があるものと考えられる。一方、量比を高めた場合は残存量がかなりあるにもかかわらず消費量はそう大きくない。このことはマスキング剤の効果ははっきり認められるわけで、葉体の性

Table 11. Results of laver culture test compared agent grade salt with industrial use grade salt using for artificial seawater medium

Flask No.	Using salt grade (Company name)	Weight (mg) (Init.-final)	Daily growth rate (%/day)
1.	Agent grade	45-129	18.9
2.		35-128	24.2
3.	(Matsunaga Chemicals & Junsei Chemicals)	47-110	15.2
4.		45-112	16.5
5.	Industrial use grade	44-149	22.5
6.		49-150	20.5
7.	(Akaho Seien Co. and Nihon Kagaku Engyo Co.)	49-115	15.3
8.		43- 89.5	13.0
9.	Industrial use grade	44-110	15.0
10.		48-118	16.9
11.	(Naikai Engyo Co.)	48-155	27.0
12.		44-117	10.9

Table 12. Results of laver culture test compared pure CO₂ gas with boiler waste gas enriched for aeration (Test I on Table 5)

	Used gas	Enriched rate to air	CO ₂ level in air	Daily growth rate (%/day)	State of thalli
Control	Pure CO ₂	0.1%	0.10	20.6	Good
Test	Boiler waste gas	2.0%	0.12	20.6	Good

Table 13. Result of laver culture test (Test II on Table 5)

	Vessel No.	Thalli weight		Daily growth rate (%/day)	State of thalli
		Init.-final (g dry)	Final/Init.		
Control	1	0.140-0.272	1.94	8.3 } Average 8.8	Good
	2	0.140-0.292	2.08		
Test	3	0.140-0.279	1.99	8.7 } Average 9.1	Good
	4	0.140-0.293	2.09		

状をみても添加量を5倍、10倍と増やすと葉体が厚くなるのに比べ量比の変更は葉体の性状を変えるに至っていない。

Table 10 は幼芽に対する影響を検べた試験の結果である。この場合は Table 7, 8, 9 と異なり、P1 sol. の影響はかなり顕著である。即ち着生幼芽数で比較すると、添加量の0の区やマスキング量比0/1の区では極度に芽数が少く対照区の1割以下である。一方5倍量区や5/1, 10/1 区では対照区を遙かに上まわる着生数を示した。ただ着生した芽の大きさは必ずしも着生数の多い区が良いとはいえず、むしろ対照区より劣る傾向にあり、このことは着生した幼芽の生育は他の要因、例えば光量などに支配されるのであろうことを示唆している。培養液中の鉄塩の消長は葉体の場合とは同じであるが対照区の残存量がやや多く余裕のあることを示している。

工業用塩 人工海水に用いる食塩と硫酸マグネシウム

を試薬1級から工業用塩に代えた場合のノリ葉体の培養試験結果を Table 11 に示した。表では工業用塩の二区をメーカー別によって試薬1級の対照区と比較したが二区とも重量増加も、またしたがって日生長率も対照区とほぼ同じでメーカー間、等級間の差は認められなかった。

ボイラー廃ガス ボイラー廃ガスを純炭酸の代用とした試験は Table 5 に I, II, III と示したように3回実施した。各回毎の結果を Table 12, 13, 14 にそれぞれ表示した。I は予備テストで Table 12 の結果では廃ガス中の亜硫酸ガス濃度 300 ppm であったが培養には何等の異常も認められなかった。II は高培養密度条件下の試験で、ノリ葉体の培養密度を高め供給ガス量を海水に対して増すことにより亜硫酸イオンが急激に増加蓄積することの影響を調べたものである。即ち 2 l 円筒槽各2基を1区とし葉体を 1~0.5 g/l 浮遊させた試験で通気量は 1.5 l/min とした。純炭酸ガスは通気に対して 0.05%、

Table 14. Results of laver culture test (Test III on Table 5)

	Used gas	Vessel No.	Vessel Vol. (l)	Thalli weight Init.-Final (dry g/m ²)	Daily growth rate (%/day)	State of thalli
Control-1 low cult. density	Air + Pure CO ₂	1 — 2	2	88-124	10.9	Good
Control-2 high cult. density	Air + Pure CO ₂	3	12	895-1133	7.4	Good
Test high cult. density	Air + Boiler waste gas	4	12	880-1171	8.1	Good

Table 15. Analysis of trace & nutritional element in seawater during culture period

	EDTA (ppm)	Fe (ppm)	NO ₃ -N (ppm)	PO ₄ -P (ppm)
Initial	26.2	1.90	42.2	11.8
Final seawater of control 2	18.6	1.38	62.0	19.5
Final seawater of test	12.4	1.63	56.5	18.3

ボイラー廃ガスは0.5% いずれも明期にのみ添加し、夜間は空気のみとしたが海水 pH は明期 7.75, 暗期 8.1 となった。またボイラー廃ガスのガス分析値は O₂ 8-9%, CO₂ 8-12%, SO₂ 150-300 ppm であった。結果は Table 13 の通りで、葉体増重量は 1.9~2.09 倍でしたがって日生長率は 8.8%, 9.1% で対照区よりもボイラー廃ガス区が若干良かったが有意の差とはいえない。葉体の健全度は肉眼による外観検査、顕微鏡による細胞配列やエリスロシン染色で検したが異常は認められなかった。Ⅲは 12 l の大型槽で葉体培養密度を更に 10 倍引上げて 5~7 g/l としてその影響を確かめた。但しこのような培養密度になると光量が不足してくるので毎日一部の葉体を間引いて一定濃度になるよう心がけた。栄養塩も毎日硝酸ナトリウム 6 ppm, 第一磷酸ナトリウム 0.8 ppm を補給した。光源は 300 W のタリウム水銀灯として水中点灯して照度を確保した。明期中に通気に添加する CO₂ 濃度はボイラー廃ガス 2~4% (炭酸ガスとして 0.2~0.4%) とし、対照区も純炭酸でこれと同じとした。海水 pH はこれで明期 7~7.5 となった。なお参考のため同一葉体サンプルを用いて 2 l 槽で平行的に低培養密度の試験を併行して実施した。Table 14 でわかる通り高密度培養にすると葉体の生育は低下し、低培養密度に比べると約 7 割の日生長率 7~8%/day になったが、その中で比較するとボイラー廃ガス区の方が対照区よりも生育が良く、有害性は認められない。また高密度培養の二区とも穴あき病が散見されたが、その程度はボイラ

ー廃ガス区の方が軽かった。なお培養期間 12 日間を通算するとボイラー廃ガス中の亜硫酸ガスは 13 ml/l 添加されたことになり、念のため培養終了後の海水を用いて幼芽の試験試験を試みたが新たに製作した海水と有意差はなかった。また Table 15 に培養前後の海水の EDTA, Fe, NO₃-N, PO₄-P の分析値を示したが、この表でみると、ボイラー廃ガス区は EDTA が初発の半分以下に減じているのが目立つがその他の成分は特に問題となるものは無かった。

考 察

ノリ人工培養用海水の組成について、須藤が Provasoli の ASP 6 を改良した処方を発表し、以後多くの研究者がこの処方を準用して人工培養研究を行なっている。Table 3 にこれらを示したが、寺本は特に微量要素に注目し、マスキング剤である EDTA と重金属塩とのモル比がノリ葉体の生育や性状に関与しているとして、特に 1/1 では健全なノリが育つが生育がおそく、1.5/1 では生長は早いが罹病しやすいと報じている。³⁾ 下茂は 4/1 を基本に銅の有害性を検討し問題は生じないことを示しており、⁴⁾ 藤山は定性的に 3/1 が良いと述べる等、⁵⁾ 須藤の処方 2/1 を中心に量比については種々の論議が成されている。一方添加量についても須藤は P 1 sol. を 1~10 ml/l 添加すると幅のある処方を示しており断定的なものではない。今回これら量比と添加量についての検討を行なったものも、これら議論の集約を考えたからであるが結果からみると、添加量も量比もそれ程厳密な濃度域があるものではなくむしろノリ葉体の生育は共存する微生物や夾雑藻類の多寡に大きく影響を受けていると考えられ、これらと相関したものとして捉えるべきであろう。ただ添加量と量比のいずれが影響が大きいかという点では添加量の方が重要なようである。また幼芽と成葉体では影響の度合いがかなり異なっており成葉体では余り大きな影響の出ない濃度でも幼芽では着芽数に顕著な差を生じており、着芽数の多寡はその後の生育に功罪ともども

に影響が大きい。微量成分はしかし現存量を常時検知しているわけではないので余裕をみて添加しておくべきであって、その考えに従えば現行の2倍量程度は充分許容さるべき所である。

EDTA のキレート力は非常に強いので溶液中の重金属イオンは Table 2 に示すごとく $\log K_{MA}$ で示して 14~25 と低く抑えられており、むしろマスキングが過剰ではないとも考えられる。そこで4種のキレターを EDTA と対比して試験したが結果では DTPA や CDTA が良好で NTA, HEEDTA は不良であった。Table 2 のこれらのマスキング剤の $\log K_{MA}$ を比べると NTA, HEEDTA は EDTA よりもかなり低く、CDTA はむしろ高い。したがって生育の良好なマスキング剤はキレート化力が EDTA よりも高い物になり、それ以上の方が適しているということになる。いずれにしてもマスキング剤の試験では相互の性能の差はそれ程顕著ではなく、上述の EDTA の添加量などの論議と同じく余裕をみて与えておけば良いと言えよう。

次に微量要素ともからんで工業用塩の利用の可否を検討した。工業用塩が試薬1級より遙かに安価であるのは論を俟たないが、夾雑する重金属の含量がここでは問題である。Table 4 に示したのは成書に示された工業用塩の標準組成と微量成分の表である。⁷⁾ これによれば重金属塩の混在はそれ程多量ではない。培養試験の結果をみてもマスキング剤と重金属塩の量比 1.5/1 の人工海水において、食塩と硫酸マグネシウムを工業用塩に置換して支障は無かった。これらの塩は近年ステンレス濃縮缶を用いるので鉄分の混入が非常に減少したのだといわれる。

炭酸ガス給源としてボイラー廃ガスを用いることは単に炭酸ガスのコストを引下げただけでなく共存する亜硫酸ガスを利用して殺菌することをねらった試みである。亜硫酸ガスの殺菌作用は食品や醸造で古くから利用されているもので偶々赤ぐされ病に罹病した葉体があって、チオ硫酸ソーダを用いた所回復したことから気付いた現象である。ボイラー廃ガス中の亜硫酸ガスの量は用いる重油によって硫黄化合物含量が異なり、実験に供したボイラー廃ガスはA重油を使用しているので JIS 規格では 3% 以下 (C重油は 3.5% 以下) に規定されている。これを燃焼した時の廃ガス中の CO_2 と SO_2 の組成比は燃焼時の過剰空気率や廃ガス温度で SO_2 がミストに吸収される場合もあるので北川式検知管で検出しつつ実験に供したが、実験的には純炭酸よりも良好な成績を得た。ただ亜硫酸ガスの量が過度に多いと、生ずる亜硫酸によって海水 pH が急変することがあり、常時 pH を監視する体制が必要となる。今回のテストではボイラー廃ガ

スの利用は充分可能であることを確認するに止め、大型実験での適用は病害の発生時に対応することとした。ただこのような発想は自然海面での養殖にも応用できる技術で、東京湾のように海水交換の度合いが低く、炭酸ガス不足を生じるおそれのある海域では有効な手段と思われる。なおボイラー廃ガス試験 I, II では葉体密度と通気量が逆転しているが、丸底フラスコと 2l 槽では前者のノズル径が太く気泡が大きいのに比し、後者はエアストーンによる微細気泡であるので、ガス溶解量が著しく異なっているためである。

要 約

1. ノリ培養用人工海水の組成、特に微量要素 (P 1 sol.) について、ノリ培養試験にて検討を行ない、次の結果を得た。

1) EDTA に代るマスキング剤の探索を行ない、DTPA, CDTA は EDTA と同等かやや優れ、一方 HEEDTA, NTA はやや劣る性能を示した。

2) P 1 sol. の添加量、マスキング剤/重金属塩の量比、を成葉体培養について検討し、添加量は現行の2倍、量比は 1/2~6 倍の間で良好な成績を得た。ただ現行との差はあまり顕著ではなかった。

3) 幼芽培養についても同様の検討を行ない、着芽数に顕著な差を認めた。

2. 人工海水の主要塩である食塩、硫酸マグネシウムを試薬1級から工業用に代えたが培養成績に影響は認められなかった。

3. ノリ人工培養に用いる炭酸ガス給源として純炭酸の代りにA重油ボイラー廃ガスを用いることを検討し、培養に支障なく且つ随伴亜硫酸ガスが殺菌に有効であることを認めた。

おわりに臨み、ノリ人工培養の研究を終始主導し、かつ御鞭撻をたまわった、協和醸酵工業株式会社社長、木下祝郎博士に深謝申し上げます。

文 献

- 1) 須藤俊造: 水産増殖, 7, 7-11 (1960).
- 2) 今田 克, 斉藤祐一: 水産増殖, 32, 102-114 (1984).
- 3) 寺本賢一郎, 木下祝郎: 藻類, 17, 29-33 (1969).
- 4) 下茂 繁: 農電研究所報告, 71002, 1-81 (1971).
- 5) 藤山虎也: 水産増殖, 7, 97-102 (1960).
- 6) 日本化学会編: 化学便覧, 丸善, 東京, 1966, pp. 1305.
- 7) 堀部純男編: 海水の化学, 東海大学出版会, 東京, 1970, pp. 453.