

メタン発酵消化液利用による微細藻培養時の雑菌抑制効果

(株)大林組 正会員 ○山本 縁, 正会員 大島 義徳
フェロー会員 千野 裕之, 小川 幸正

1. 目的

ヘマトコッカスは、抗酸化物質として注目されている赤色のアスタキサンチンを産生する藻類として知られている。しかし、生育が遅く安定した培養が難しい。

このヘマトコッカスを人工培地のガンボーク培地で培養すると、カビが発生する現象が見られた。一方で、1/15~1/25に希釈した消化液を培地に利用した場合、雑菌が繁殖することなく良好に生育した¹⁾。上記の現象により、消化液には、雑菌の生育を抑制する効果があると考えた。

そこで、培養液に消化液を添加することで、雑菌の生育が抑制できるか、培養試験を実施した。

2. 試験方法

試験は観察のしやすさから固相表面培養で行った¹⁾。培養液に不織布を浸し、その上にヘマトコッカス(NIES-144)を塗布したメンブレンフィルターを載せ、これをCO₂充填袋内に入れ、照明付きインキュベータ(25℃)で静置培養した。表1に培養条件、表2に試験に供試した人工培地のガンボークB5培地組成、表3に添加ビタミン、表4に消化液の性状を示した。なお、消化液は

前報で良好に生育した1/15ろ過消化液を使用した¹⁾。培養試験は試験Aと試験Bの2種類行い、表5及び表6に示した。

試験Aは、表5に示すとおり培養液を5種類作成した。①から④はガンボーク培地を80%とし、残り20%分を水と1/15ろ過消化液の混合比を変えた培養液とした。試験Bは、表6に示すとおり培養液を6種類作成し、①から⑤はガンボーク60%とし、残り40%分を水と1/15ろ

過消化液とした。培地の割合以外は、培養試験Aと同様に行った。それぞれ藻類の観察及び藻体増加量の測定を行った。

3. 実験結果と考察

3-1. 観察状況

表7に試験A、表8に試験Bの生育状況を示した。

(1)試験Aの生育状況

培養2日では、培養液の種類に関係な

表1 培養条件

使用培地	・人工培地(ガンボーク B5+ビタミン) ・1/15ろ過消化液(0.1 mm 目の金網で簡易ろ過)
藻類	ヘマトコッカス (<i>Haematococcus lacustris</i> NIES-144)
CO ₂ 濃度	5%程度
設置場所	インキュベータ内
光強度	90~93 μmol/m ² /s, 24h 明
温度	25℃
培養期間	5日間

表2 ガンボークB5培地組成(/100 mL)

KNO ₃	250 mg
(NH ₄) ₂ SO ₄	13.4 mg
NaH ₂ PO ₄ · H ₂ O	15 mg
KNO ₃	250 mg
KI	0.075 mg
FeSO ₄ · 7H ₂ O	2.78 mg
Na ₂ EDTA	3.73 mg
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	0.2 mg
MgSO ₄ · 7H ₂ O	25 mg
MnSO ₄ · H ₂ O	1 mg
Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	0.025 mg
CuSO ₄ · 5H ₂ O	0.0025 mg
CoCl ₂ · 6H ₂ O	0.0025 mg
CaCl ₂ · 2H ₂ O	15 mg
H ₃ BO ₃	0.3 mg
KI	0.075 mg

表5 試験A培養液組成

培養液	構成割合 (%)				
	人工培地 (ガンボーク B5) 80 %溶液				1/15ろ過消化液
	①	②	③	④	⑤
ガンボーク溶液	80	80	80	80	0
イオン交換水	20	15	10	0	0
1/15ろ過消化液	0	5	10	20	100
備考(消化液分)%	0	0.33	0.67	1.3	6.7

表3 添加ビタミン(/100 mL)

Vitamin B ₁₂	0.01 μg
Biotin	0.01 μg
Thiamine HCl	1 μg

表4 消化液の性状

水質項目	測定値
pH	7.7
EC (mS/m)	1100
TS (%)	2.8
VTS/TS (%)	59
BOD (g/L)	1.2
TOC (g/L)	6.2
T-N (g/L)	2.5
D·T-N (g/L)	2.0
NH ₄ -N (g/L)	1.7
T-P (g/L)	0.31
PO ₄ -P (g/L)	0.16

表6 試験B培養液組成

培養液	構成割合 (%)				
	人工培地 (ガンボーク B5) 60 %溶液				1/15ろ過消化液
	①	②	③	④	⑤
ガンボーク溶液	60	60	60	60	0
イオン交換水	40	30	20	10	0
1/15ろ過消化液	0	10	20	30	100
備考(消化液分)%	0	0.67	1.3	2.0	6.7

キーワード メタン発酵消化液, 微細藻類, ヘマトコッカス

連絡先 〒204-8558 東京都清瀬市下清戸4-640 (株)大林組 技術研究所 環境技術研究部 TEL 042-495-1068

く藻が生育した。これに対し、5日経過すると表7に示すとおり、①ガンボーク培地80%及び②人工培地80%、1/15ろ過消化液5%（消化液として全体の0.33%）の培養液で培養した藻にカビが発生した。1/15消化液を10%（消化液として0.67%）以上含有させた③～⑤の培地では、カビの発生が見られなかった。

(2)試験Bの生育状況

試験A同様、2日経過では、培養液に関係なく藻が生育した。5日経過すると、表8に示すとおり、消化液の添加がない①ガンボーク培地60%で培養した藻は、カビが発生した。②～⑥の1/15消化液を10%（消化液として0.67%）以上含有させた培地ではカビが観察されなかった。

以上より、ガンボーク培地の濃度が異なる試験A及び試験Bは、ともに培地に消化液を0.67%以上含有させた培地で、カビを抑制できることがわかった。

3-2. 藻体増加量

表9に試験A、表10に試験Bの培養5日後の藻体増加量を示した。表中の藻体増加量は5日経過後の藻体乾燥重量から、初期菌体重量を引いた重量増加分を示した。なお、表9の①、②及び表10の①は、カビの重量を含んだ値である。

表9、表10より、消化液の添加量と藻体増加量に明確な差は見られなかったが、カビが発生した表9の①、②及び表10の①は、増加量が少ない傾向が見られた。カビの発生により、生育が阻害されたと思われる。カビの発生を抑制することで、藻体収量の減少を防止できると考えられる。

4. まとめ

ヘマトコッカスを人工培地(ガンボーク B5 培地)で培養すると、5日目までにカビの発生が目視で確認されたのに対し、消化液を0.7%以上添加した場合、カビが観察されなかった。これにより、ヘマトコッカスのような生育が遅い藻類では、0.7%以上のメタン発酵消化液の添加が雑菌抑制に有効であることが示された。

上記の結果は、他の藻類においても特に野外培養など粗放的な培養で雑菌混入が問題になる場合などに、広く応用できる可能性があり、今後の研究に活かしたい。

参考文献

1) 山本緑他:メタン発酵消化液利用による微細藻ヘマトコッカスの培養に関する検討,土木学会第69回年次学術講演会概要集, VII-027, pp.53-54, (2014)

謝辞 研究に関して、東京薬科大学の都筑幹夫教授にご協力いただきました。ここに感謝を表します。

表7 試験Aの生育状況

培養液	試験開始日	5日経過後
①ガンボーク 80 %		カビ発生
②ガンボーク 80 % + 消化液0.3 %		カビ発生
⑤ガンボーク 80 % + 消化液0.7 %		

表8 試験Bの生育状況

培養液	試験開始日	5日経過後
①ガンボーク 60 %		カビ発生
②ガンボーク 60 % + 消化液0.7 %		
⑤消化液6.7 % (1/15消化液)		

表9 試験Aの藻体増加量

培養液	初期菌体量 (乾重 g/m ²)	藻体増加量	
		5日目 (g/m ² /5日)	5日目 (g/m ² /日)
①ガンボーク 80 %	18.2	41.0	8.2
②ガンボーク 80 % + 消化液 0.3 %		51.0	10.2
③ガンボーク 80 % + 消化液 0.7 %		55.4	11.1
④ガンボーク 80 % + 消化液 1.3 %		61.1	12.2
⑤消化液 6.7 % (1/15ろ過消化液 100 %)		52.8	10.6

表10 試験Bの藻体増加量

培養液	初期菌体量 (乾重 g/m ²)	藻体増加量	
		5日目 (g/m ² /5日)	5日目 (g/m ² /日)
①ガンボーク 60 %	18.2	52.5	10.5
②ガンボーク 60 % + 消化液 0.7 %		61.9	12.4
③ガンボーク 60 % + 消化液 1.3 %		62.9	12.6
④ガンボーク 60 % + 消化液 2.0 %		58.2	11.6
⑤ガンボーク 60 % + 消化液 2.7 %		57.0	11.4
⑥消化液 6.7 % (1/15ろ過消化液 100 %)		52.3	10.5