

## 微小藻種 5 種の培養試験と二枚貝に対する餌料価値

高島 葉二・児玉 正碩・柳田 洋一・川野辺 誠

### はじめに

ウバガイ、チョウセンハマグリ等外海砂浜性の大型二枚貝の栽培漁業を推進するため、種苗生産技術開発、量産技術の開発が進められてきた。しかし二枚貝類の餌料として開発され普及している藻類は *Pavlova luteoheri* の他に *Chaetoceros* 属の 2、3 種があるにすぎず、これらの餌料で種苗の量産化を進めてきた過程では、餌料藻の大量確保の問題や種苗の大きさに応じた餌料価値の高い藻種が必要になってきている。

過去 4 か年に渡り新たな餌料藻種の探索を行いハプト藻 10 種 プラシノ藻 3 種 珪藻 1 種について培養試験、餌料効果試験を行い、これらのなかから現在使用している *Pavlova luteoheri* と同程度の餌料効果を持つ微小藻種 4 種を開発した。本研究では *Pavlova sp.*, *Isochrysis sp.*, *Chaetoceros gracilis*, *Pyramimonas parkeae* の水温別増殖特性、培養日数別に獲得できる細胞数を明らかにしたので報告する。

稿を進めるにあたり、種株の提供ならびに有益なるご助言ご指導を賜った筑波大学 生物科学系 原 慶明助教授に深謝します。

本研究は、国補事業「水産業特定研究開発促進事業」により行った。

### 1. 培養水温別増殖特性

#### <材料と方法>

試験区は 15°C、20°C、30°C の 4 区を設けた。培養は遮光した低温恒温機内で行い、培養用容器の片側面から照度 3,000 lux になるように 20w 蛍光灯 2 本で照明した。培養容器には 2 l 平底フラスコを用い直径 6 mm のガラス管 1 本で通気した。栄養塩組成を表 1 に示した。試験開始時の細胞濃度が 10 万細胞/ml になるように接種した。2 日毎にトーマの血球計算盤で細胞数を計数し、14 日間の増殖経過を調べた。

#### <結 果>

培養水温は 15°C 区で 15.1°C から 15.2°C の範囲で変動し平均 15.1°C であった。同様に 20°C 区で 20°C から 20.4°C 平均 20.2°C、25°C 区で 24.2°C から 25.5°C 平均 25.0°C、30°C 区で 29.6°C から 30.4°C 平均 30.1°C であった。

藻種毎に水温別の細胞数の変化を図 1 から図 3 に示した。*Pavlova sp.* では、培養初期には高い水温ほど増殖速度が大きく、培養 8 日目に 30°C 区で 722 万細胞/ml、25°C 区で 660 万細胞/ml、20°C 区で 508 万細胞/ml、15°C 区で 171 万細胞/ml に達した。その後 30°C 区より 25°C 区の細胞数が多くなり、14 日目に 30°C 区で 802 万細胞/ml、25°C 区で 1,250 万細胞/ml に達した。20°C 区でも 14 日目に 1,040 万細胞/ml になった。15°C でも増殖速度は遅いものの 14 日目に 857 万細胞/ml になり、30°C

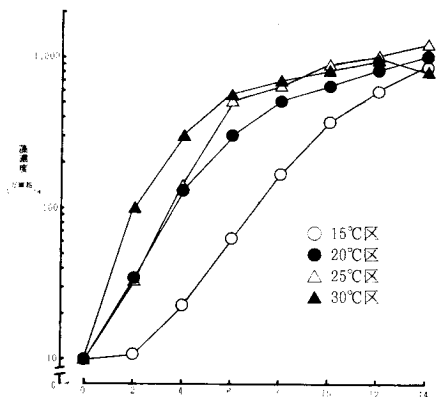


図1 *Pavlova sp.*の水温別増殖経過

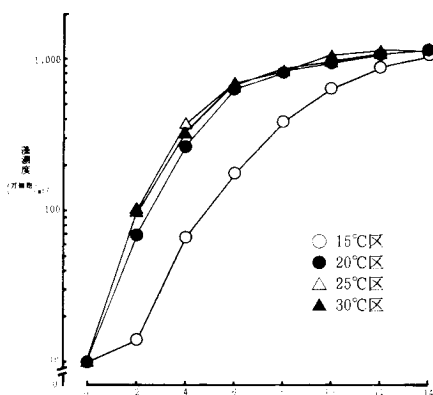


図2 *Isochrysis sp.*の水温別増殖経過

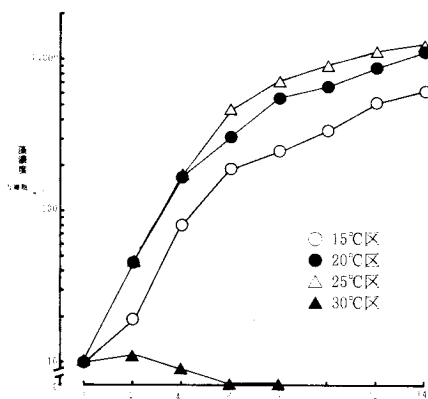


図3 *Pavlova lutheri*の水温別増殖経過

区より高い濃度を示した。*Isochrysis sp.*では20℃、25℃、30℃区では大きな差がなく経過し、12日目にはいずれも1,000万細胞/mlに、14日には1,100万細胞/mlに達した。15℃区での増殖は20℃以上の試験区より遅く経過したものの14日目には1,000万細胞/mlに達した。

*Pavlova lutheri*の30℃区では、枯死する細胞が認められ、細胞数は減少し、増殖しなかった。しかし、20℃区と25℃では *Pavlova sp.*, *Isochrysis sp.*の同水温と同様な増殖経過を示し、14日目には両区とも、1,000万細胞/mlに達した。15℃区では20℃区、25℃区より遅い増殖経過を示し、14日目でも619万細胞/mlの低い細胞濃度であった。

これらの培養結果から2日毎の生育速度定数 ( $1/t \log N_2/N_1 = kg$ ) の最大値を求め水温別に図4に示した。*Pavlova lutheri*では20℃と25℃

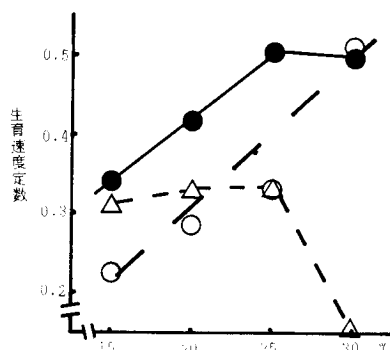


図4 水温と生育速度定数の関係

- *Pavlova sp.*
- *Isochrysis sp.*
- △ *Pavlova lutheri*

では大きな差がなく、15℃で僅かに低く30℃では前述の通り増殖しなかったことから、*Pavlova lutheri*の増殖適性水温は20℃から25℃付近にあるものと考えられる。*Isochrysis sp.*では15℃から25℃の間は水温が高くなるほど高い生育速度定数を示し25℃と30℃では差がないことから、25℃

藻類の培養試験と餌料価値

から30°Cが増殖適性水温と考えられる。*Pavlova sp.*では30°Cまで水温の上昇に相応して生育速度定数が高くなり、より高い水温が適性水温の可能性はあるものの、30°C区では細胞数の減少が認められたことから30°C付近が適性水温域にあるものと考えられる。すなわち、*Pavlova sp.*, *Isochrysis sp.*, *Pavlova lutheri* の順で高い水温で増殖するものと考えられた。

2. 50 ℓ 容器での増殖経過と培養日数別細胞濃度  
 <材料と方法>

培養容器、栄養塩組成、水温等は、現在種苗生産規模で培養している *Pavlova lutheri* と同一条件で行い、下記に示した。

培養容器：ガラス管 2本で通気した50 ℓ 透明アクリル容器 (25×50×53cm)。培養毎に塩素処理を施し 2 時間乾熱滅菌した。

培養用海水：茨城県水産試験場栽培漁業センターの一次濾過海水を 5 μm のミリポア社製フィルターで再濾過後、90 °Cで流水加熱滅菌した。

栄養塩組成：NaNO<sub>3</sub> 500g + D.W = 10 ℓ  
 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 12H<sub>2</sub>O 250g + D.W = 10 ℓ  
 クレワット32 500g + D.W = 10 ℓ  
 ビタミンB<sub>1</sub> 2g, B<sub>12</sub> 40mg, H 20 mg + D.W = 10 ℓ

珪酸ソーダ 250g + D.W = 5 ℓ

これを遮光保存し使用時にビタミンは1万倍に、その他は1,000倍希釈になるように培養用海水に添加し培養液とした。珪酸ソーダは *Chaetoceros gracilis* のみに添加した。

接 種：試験管で保存した種株を 2 ℓ 枝付きフラスコで培養後さらに15 ℓ ガラス瓶で培養したものを500ml用いた。

培 養 室：エアコンディショナーで室温を調整し、17~26°Cで培養した。各培養用容器の両側から40wの蛍光管計 4 本で照明した。

増殖経過の観察は前述の 3 種と *Chaetoceros gracilis*, *Pyramimonas parkeae* について行った。*Pyramimonas parkeae* で 2 例、そのほかの、藻種では 6 例について調べた。培養は前回測定時の細胞濃度より低くなるか枯死するまで行った。

培養日数別細胞濃度は50 ℓ 容器で上述の方法で培養し1989, 1990年度のチョウセンハマグリ、ウバガイの種苗生産に使用した2, 180の培養例について培養日数別に細胞濃度の平均値を求め図中にプロットすることによって調べた。細胞濃度を測定しないで餌料として使用したものを含めて培養事例数、測定事例数及び測定値の平均等を表 1 に示した。なお、15 ℓ 容器で培養後50 ℓ 容器に展開した時の初期濃度は測定しなかった。

表 1 50 ℓ 容器における藻種別培養日数別細胞濃度

藻 種	事例数	測定数	増殖不調事例数	増殖不調率 %	平均培養日数(日)	平均濃度 万細胞/ml
<i>Pavlova lutheri</i>	1,505	861	477	31.7	16	929
<i>Pavlova sp.</i>	535	357	84	15.3	16	1,440
<i>Isochrysis sp.</i>	85	42	17	20.0	20	1,125
<i>Chaetoceros gracilis</i>	34	34	0	—	23	434
<i>Pyramimonas parkeae</i>	21	21	0	—	23	185

## 結 果

増殖経過を図5に示した。*Pavlova lutheri*, *Pavlova sp.*, *Isochrysis sp.*, *Chaetoceros gracilis*では培養10日目ごろから定常期に入り *Pavlova lutheri*, *Isochrysis sp.*では1,000万細胞/ml前後を、*Pavlova sp.*では2,000万細胞/ml前後を、*Chaetoceros gracilis*では500万細胞/ml前後を推移した。*Pyramimonas parkeae*では例数が少なく明かではないが200万細胞/ml前後が定常期と思われた。

培養日数別細胞濃度における培養期間は目の成長に伴い給餌量が増加し培養量が不足することあるいは種苗の放流により過剰になることがあり7日間から47日間の広い幅があった。*Pavlova lutheri*で細胞濃度を測定した例では8日間から40日間、平均16日間、*Pavlova sp.*では13日間から

47日間、同16日間、*Isochrysis sp.*では7日間から49日間、同20日間、*Chaetoceros gracilis*では12日間から47日間、同23日間、*Pyramimonas parkeae*では13日間から47日間、同23日間であり *Pavlova lutheri*, *Pavlova sp.*で短く *Isochrysis sp.*, *Chaetoceros gracilis*, *Pyramimonas parkeae*の順で長い培養期間であった(表1)。培養事例数は餌料として主に使用している *Pavlova lutheri*, *Pavlova sp.*が多くそれぞれ、1,505、535例であった。試験的に使用している *Isochrysis sp.*, *Chaetoceros gracilis*, *Pyramimonas parkeae*では21から85例と少なかった。*Pavlova lutheri*では枯死あるいは変色による増殖不調例が多く、事例数に対する割合は31.7%でありほかの藻種より高かった。*Pavlova sp.*では15%、*Isochrysis sp.*では20%の増殖不調例があった。*Chaetoceros gracilis*, *Pyramimonas parkeae*では増殖不調例はなかった。培養期間に差があるものの平均細胞濃度では、

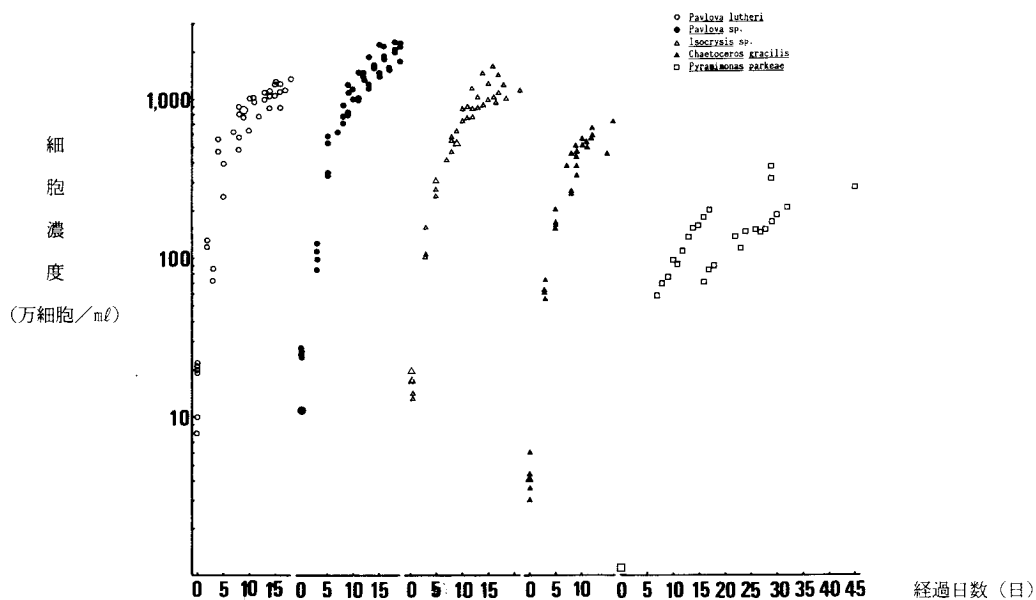


図5 50ℓ容器における増殖経過

*Pavlova lutheri* が929万細胞/ml、*Pavlova sp.* が1,440万細胞/ml、*Isochrysis sp.* が1,125万細胞/ml、*Chaetoceros gracilis* が434万細胞/ml、*Pyramimonas parkeae* が185万細胞/ml であり *Pavlova sp.* が最も高かった。

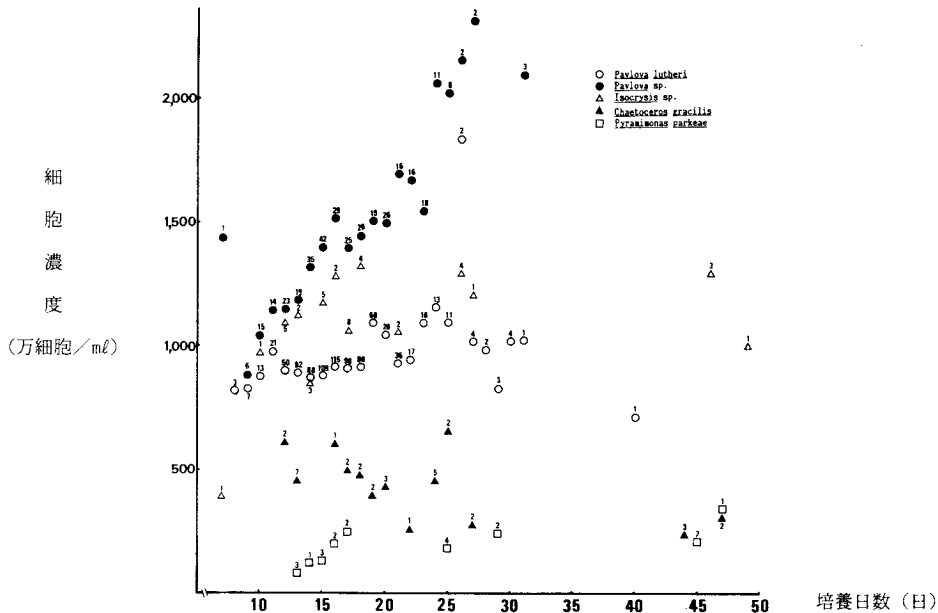
培養日数別細胞濃度を図6に示した。*Pavlova lutheri*、*Isochrysis sp.* は培養日数に関わらず1,000万細胞/ml前後を、*Pyramimonas parkeae* では200万細胞/ml前後を、*Chaetoceros gracilis* では20~25日目には500万細胞/ml前後であったが45日目前後には300万細胞/mlを示した。これらに対し *Pavlova sp.* では培養日数が増えると細胞濃度も高く、10日間前後の培養で1,000万細胞/ml、25日間前後の培養で2,000万細胞/mlであった。これらの細胞濃度は増殖経過で認められた定常期の細胞濃度とよく一致した。

## 考 察

培養水温別に増殖特性を調べた結果、増殖適性水温は *Pavlova sp.* で30℃付近に、*Isochrysis sp.* では25~30℃付近に、*Pavlova lutheri* では20~25℃付近にあるものと考えられた。

50 l 容器における増殖経過では、培養初期の増殖量は *Pavlova lutheri*、*Pavlova sp.*、*Isochrysis sp.* では大きな差がないが定常期の細胞濃度は *Pavlova sp.* で高く2,000万細胞/ml前後を、*Pavlova lutheri* と *Isochrysis sp.* には差がなく1,000万細胞/ml前後を、*Chaetoceros gracilis* では500万細胞/mlを、*Pyramimonas parkeae* では低く200万細胞/mlを示した。

また初期濃度は不明であるが50 l 容器での培養日数別細胞濃度を比べると *Pavlova sp.* は培養日



図中の各数字は事例数を示す。

図6 培養日数別細胞濃度

数の増加に伴い細胞濃度が増加して2,000万細胞/mlに達するのに対して、*Pavlova lutheri*, *Isochrysis sp.*では培養日数に関わらず1,000万細胞/ml前後であった。*Pyramimonas parkeae*でも同様に培養日数に関わらず200万細胞/ml前後を示した。*Chaetoceros gracilis*では培養日数が増加すると低下する傾向を示し、500万細胞/mlから300万細胞/mlになった。培養中の増殖不調例を比較しても*Pavlova sp.*は*Pavlova lutheri*より増殖不調割合が低く、*Pavlova sp.*は*Pavlova lutheri*と比較すると高温度で培養が可能であり、獲得できる細胞数が多く、培養し易い藻種であることが明らかになった。

チョウセンハマグリとウバガイに対する餌料効果試験(12回)<sup>1)~4)</sup>の結果を表2に示した。各試験で対照区にした*Pavlova lutheri*の日間成長率を100とした指数で表し平均値を示した。各試験で飼育水温、餌料濃度条件が異なり単純な比較はできないものの*Pavlova sp.*, *Isochrysis sp.*, *Chaetoceros gracilis*ではチョウセンハマグリ、ウバガイとも*Pavlova lutheri*と同程度かそれ以上の日間成長率指数を示し、高い餌料価値があるものと考えられた。*Pyramimonas parkeae*では*Pavlova lutheri*より高い日間成長率を示す場合もあるが平均では低かった。給餌する餌料濃度条件、水温等により飼育成績は変わる<sup>5)</sup>が、*Pavlova sp.*は、

*Pavlova lutheri*と比較すると同程度の餌料価値があり、培養では増殖速度に大きな差はないが長期間に渡る増殖傾向を示し培養期間が長いと多くの細胞数を獲得でき、なおかつ高い水温でも増殖し、増殖不調例の少ない取扱易い藻種と考えられる。また、*Isochrysis sp.*も*Pavlova lutheri*と同程度以上の餌料価値があり培養し易い藻種と考えられた。

## 参考文献

- 1) 茨城県水産試験場(1988) 昭和62年度水産業特定研究開発促進事業 二枚貝餌料開発研究報告書(ウバガイ・チョウセンハマグリ)。
- 2) 茨城県水産試験場(1989) 昭和63年度水産業特定研究開発促進事業 二枚貝餌料開発研究報告書(ウバガイ・チョウセンハマグリ)。
- 3) 茨城県水産試験場(1990) 平成元年度水産業特定研究開発促進事業 二枚貝餌料開発研究報告書(ウバガイ・チョウセンハマグリ)。
- 4) 茨城県水産試験場(1991) 平成2年度水産業特定研究開発促進事業 二枚貝餌料開発研究報告書(ウバガイ・チョウセンハマグリ)。
- 5) 高島 葉二・児玉 正碩(1991) 異なる餌料藻種・餌料濃度による二枚貝の飼育試験と濾水量の変動 茨水試研報、**39**, 3c。

表2 餌料効果試験の日間成長率指数\*の平均と変動範囲

貝種	藻種	<i>Pavlova sp.</i>	<i>Isochrysis sp.</i>	<i>Chaetoceros gracilis</i>	<i>Pyramimonas parkeae</i>
チョウセンハマグリ		126±34	165±49	104±10	65±19
		77~188 (9)	94~231 (7)	100~122 (5)	51~78 (2)
ウバガイ		94±23	117±48	136±58	70±55
		62~123 (6)	76~170 (3)	61~219 (5)	20~129 (3)

\* 試験毎に対照とした*Pavlova lutheri*の成長率を100とした指数で示した。  
( )内は試験例数