

昭和 61 年 度

**特定研究開発促進事業**

**初期餌料の培養技術向上に  
関する研究報告書—VI**

**昭和56年～61年度研究結果の概要**

昭和 62 年 1 月

石 川 県 増 殖 試 験 場

# 目 次

## 昭和61年度特定研究開発促進事業研究報告

I	テトラセルミスと海産クロレラの含有色素 .....	1
II	濃縮凍結クロレラを用いたワムシ培養 .....	5
III	供試クロレラのワムシ餌料としての効果 .....	8

	昭和56～61年度研究結果の概要 .....	12
--	------------------------	----

### <担当者>

石川県増殖試験場.....生産第1科

技 師 杉 本 洋 (主担当)

” 石 中 健 一

” 沢 矢 隆 之

科 長 田 島 迪 生

### <協力機関>

長崎県水産試験場増養殖研究所

熊本県水産試験場大矢野支場

広島県水産試験場

神奈川県淡水増殖試験場

青森県水産増殖センター

沖縄県水産試験場八重山支場

### <助言指導>

養殖研究所、遺伝育種部育種研究室

ワムシの安定大量培養技術の確立を目的として、56年度はワムシ増殖の基礎になる産仔数の実験を行い、処女生殖個体および両性生殖個体の各水温での産仔数、生存日数（寿命）を明らかにした。57年度はワムシの摂餌量試験、系統別ワムシの増殖特性の究明試験、さらにクロレラに替る餌料としてのテトラセルミスの研究を行い、テトラセルミスはワムシの餌料として有効であることを明らかにした。58年度はテトラセルミスの増殖への水温と施肥量の影響、ワムシ接種時のテトラセルミスの必要量を明らかにした。またクロレラ培養槽に出現するプロトゾアの塩素による除去試験を行い、プロトゾアの除去には、次亜塩素酸ナトリウムが有効であることを、59年度はテトラセルミスの増殖と照度の関係、テトラセルミスを餌料としたワムシの産仔数、濃縮凍結クロレラのワムシ餌料としての有効性、ならびに系統別ワムシの増殖特性の究明試験を行い、濃縮凍結クロレラがワムシ培養に有効であることを明らかにした。60年度はテトラセルミスの炭酸ガスおよび栄養塩要求、濃縮凍結クロレラを餌料としたワムシの産仔数、濃縮凍結クロレラを用いたワムシ培養、ならびに供試クロレラについて研究し、テトラセルミスの培養に炭酸ガス通気が有効なこと、テトラセルミス細胞数とクロロフィル $\alpha$ 含量に相関があること、さらに養殖研株のクロレラが石川増試のクロレラより冬期培養に適していることを明らかにした。

本年度は、テトラセルミスと海産クロレラの含有色素、濃縮凍結クロレラを用いたワムシ培養試験、ならびに供試クロレラについてワムシ餌料としての効果を調べる研究を行った。

## I テトラセルミスと海産クロレラの含有色素

テトラセルミス培養液中に海産クロレラが混入することが多い。そこで両種の混合割合を簡便に判定する方法を考案するために両種の光合成色素を比較検討した。

### 〔材料と方法〕

#### 1) 供試材料

当場にて培養中のテトラセルミスと海産クロレラを実験に用いた。

#### 2) 測定及び分析

生藻体の吸収スペクトルは培養液をそのまま使用し、オパールグラス法によって測定した。また含有色素の抽出は各培養液をガラスフィルター（17G-4）で濾過し、100%メタノールで行い、さらに、得られたメタノール色素溶液をエチルエーテルに転溶、濃縮し、エチルエーテル濃縮色素溶液を得、この溶液中の色素をセルロースパウダーカラムクロマトグラフィーにより分析した。

### 〔結果と考察〕

テトラセルミスおよび海産クロレラの生藻体での吸収スペクトルを図1、差スペクトルを図2に示した。両吸収スペクトルは共に670~680nmの間に赤色光域の吸収極大と435nm付近に青色光域の極大を持っている。しかしテトラセルミスのスペクトルでは650nm付近に顕著な吸収の肩があり、さらに、435nmの極大に対する480nmの吸光値比が海産クロレラのものに比べ著しく高い。一方両種の差スペクトルでは凹凸を示し、435nm、527nmに吸収の山、474nm、650nmに吸収の谷がある。このように両種

の吸収スペクトルが異なり、かつ、差スペクトルに吸収の山と谷が見られることは両種の含有色素に差があることを意味する。そこで両種に含まれている色素をカラムクロマトグラフィーで分離した。

カラムクロマトグラフィーで得られた溶出曲線を図3、4に示した。テトラセルミスから7種類の緑色色素分画と4種類の黄色色素分画が、海産クロレラから6種類の緑色色素分画と4種類の黄色色素分画が得られた。緑色色素のうち両種に共通して含まれている色素はクロロフィルaのみである、特異的なものはテトラセルミスのクロロフィルbであった。テトラセルミスでの70~94、108~114分画ならびに海産クロレラでの62~88、92~108分画はクロロフィルの分解産物あるいは変性物と思われる、さらにそれぞれの144~153、164~170、183~188分画ならびに157~165、171~174、180~183分画の色素は不明な点が多く論議を省く。海産クロレラからクロロフィルcは分離されなかった。クロロフィルcは比較的変性し易く、藻体が正常でなかったことも考えられ、この色素の含有については更に検討を要する。黄色色素では、図6に示した吸収スペクトルに見られるように、両種で共通した色素はβ-カロチンのみであった。海産クロレラでの14分画の吸収スペクトル(図6-Bの破線)はアスタキサンチンと良く似たスペクトルを示し、実際に含まれているものか、混入生物によるものか更に検討の必要がある。

次に両種の含有色素の比について、テトラセルミスのβ-カロチン含有比が海産クロレラのものに比べてはなはだ多い。全体的にクロロフィルa系色素に対するカロチノイド系色素の割合は海産クロレラに比べ、テトラセルミスで高い傾向が見られた。すなわち、両種の色素組成の差は、クロロフィルbが存在するか否か、さらにクロロフィルa系色素とカロチノイド系色素の含有比が異なることであった。

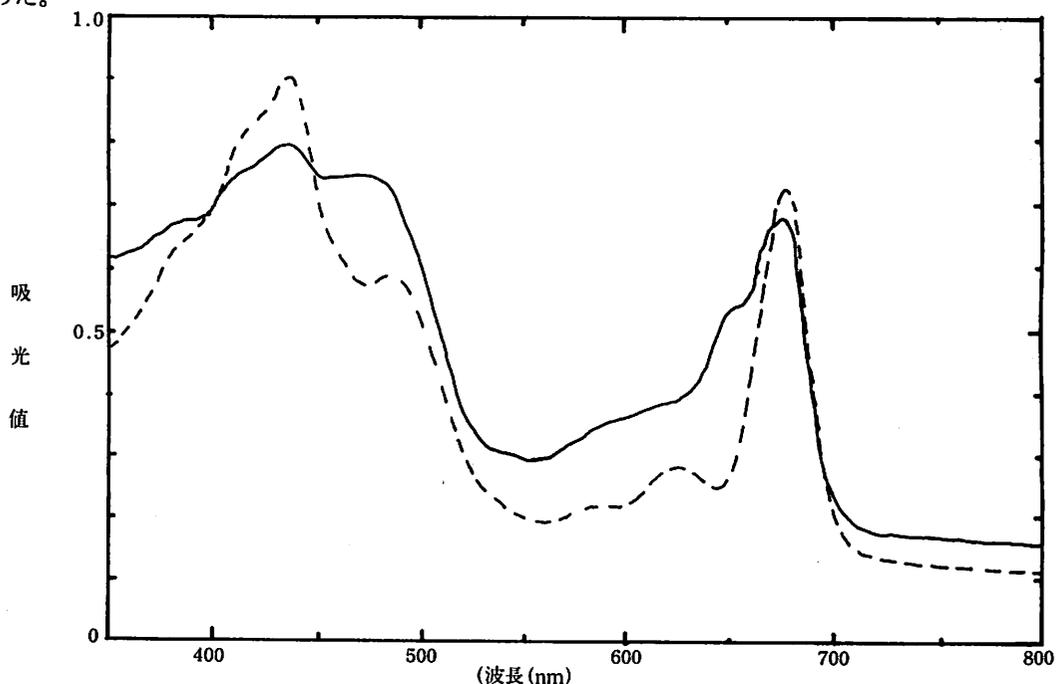


図1 テトラセルミスと海産クロレラの生藻体での吸収スペクトル  
実線：テトラセルミス、破線：海産クロレラ

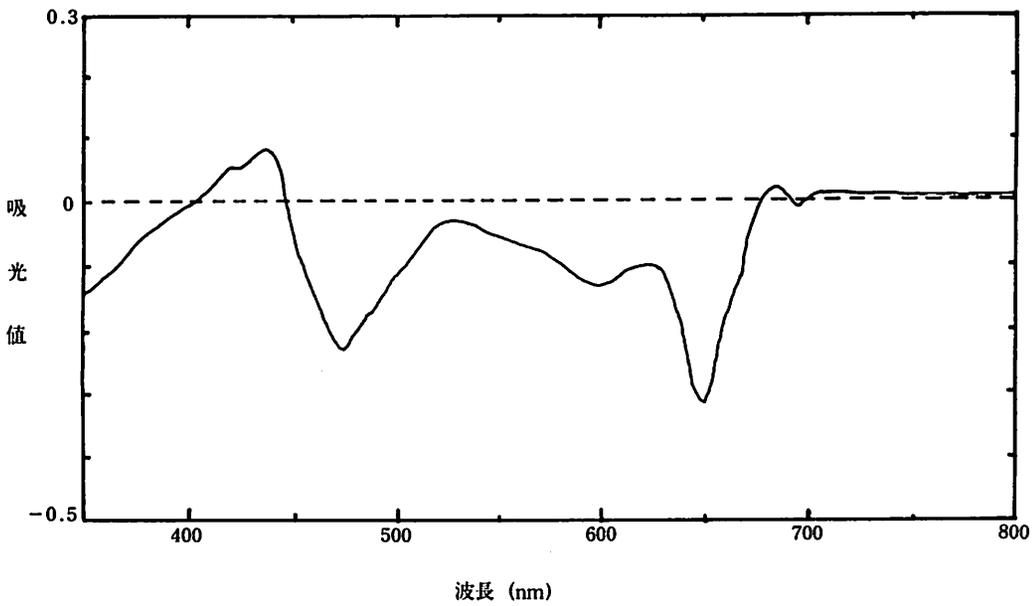


図2 テトラセルミスと海産クロレラの生藻体での吸収差スペクトル  
 テトラセルミス：対照側、海産クロレラ：試験側

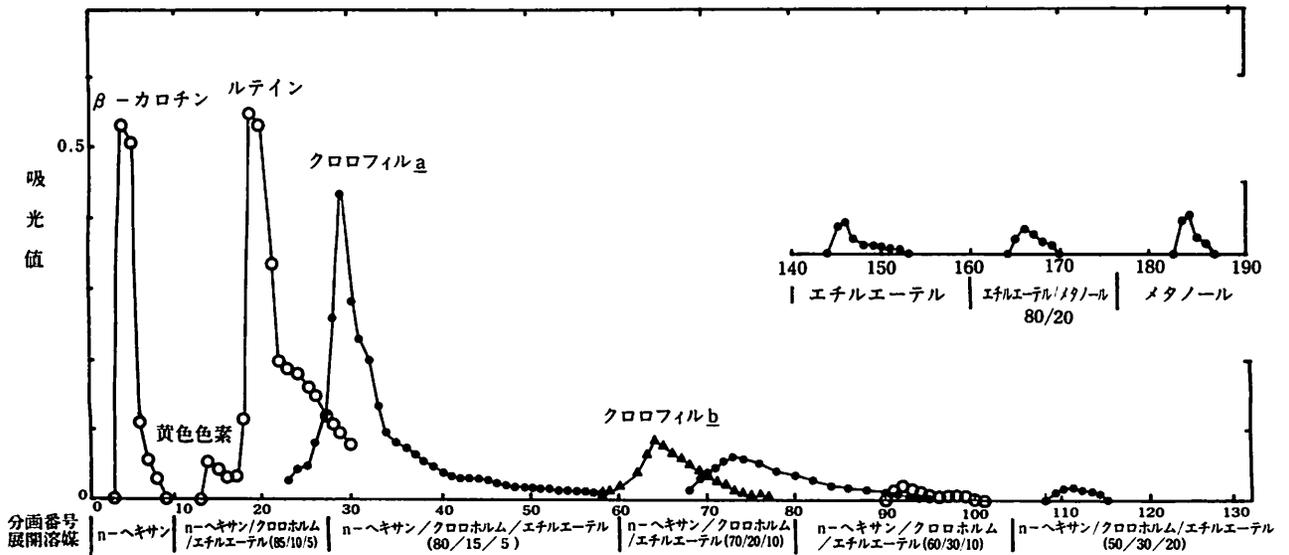


図3 テトラセルミスに含まれる色素のカラムクロマトグラフィーによる分析結果

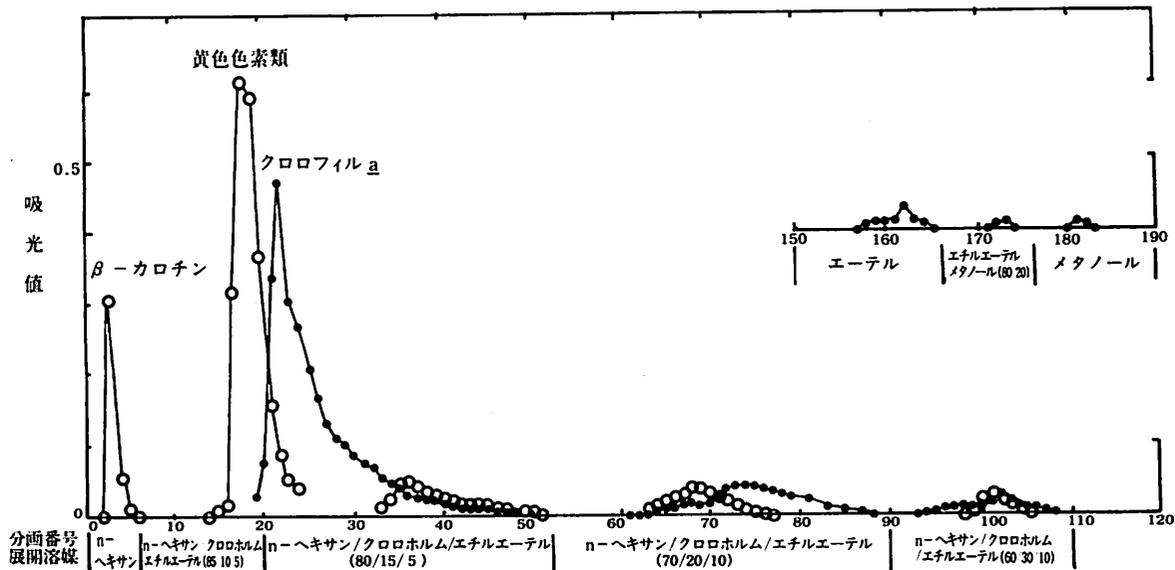


図4 海産クロレラに含まれる色素のカラムクロマトグラフィーによる分析結果

図5 テトラセルミスから検出されたクロロフィルaとbの吸収スペクトル

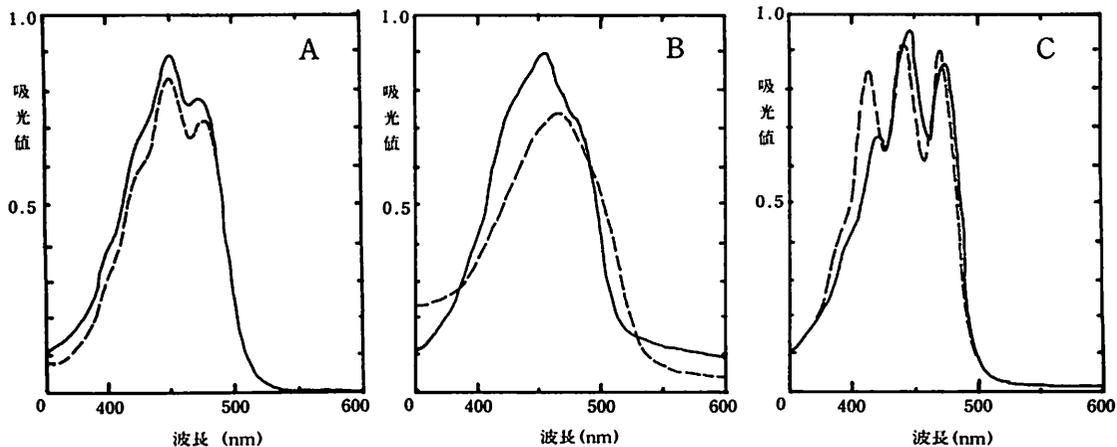
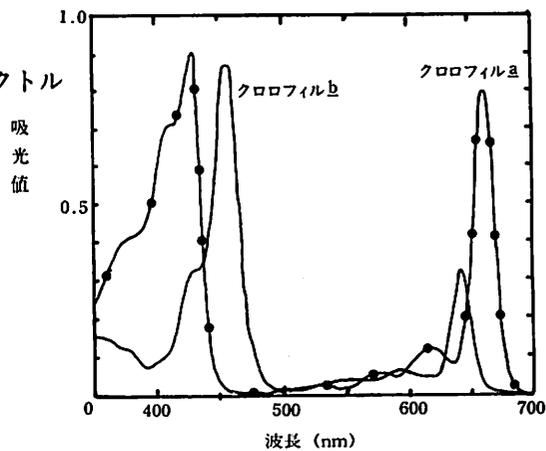


図6 テトラセルミスと海産クロレラから検出されたカロチノイドの吸収スペクトル (実線: テトラセルミス、A:  $\beta$ -カロチン、B: 14分画、C: 19分画、破線: 海産クロレラ、A:  $\beta$ -カロチン、B: 15分画、C: 18分画)

## II 濃縮凍結クロレラを用いたワムシ培養

濃縮凍結クロレラを用いたワムシの培養では、沈殿したクロレラのワムシ摂餌の有無、あるいはワムシ増殖への影響などを知る必要がある。そこで、沈殿の比率を変えた培養液を用いて、ワムシの比較培養試験を行い、濃縮凍結クロレラの使用に際しての参考とするため、以下の実験を行った。

### 〔材料と方法〕

#### 1) 供試ワムシ

昭和50年1月に瀬戸内海栽培漁業センター（現日本栽培漁業センター）屋島事業所で分離乾燥保存を行った耐久卵由来のL型ワムシを培養し、昭和57年4月に当場で新たに分離乾燥を行って得た耐久卵を61年9月に孵化させ実験に用いた（平均背甲長 $263\mu$ ）。

#### 2) 餌料

実験に使用したクロレラは当場で数年間に渡り継続培養したものであり、濃縮は日本栽培漁業協会能登島事業所で行い濃縮後直ちに凍結した。生クロレラは恒温室内で培養したものを、また、濃縮凍結クロレラは滅菌海水に溶解したものをそれぞれ約3500万セル/mlの濃度となるように調製し使用した（L型ワムシの摂餌量が約10万セル/ml/日であり実験を3～4日間として）。

#### 3) 試験区の設定

実験には30ℓポリカーボネイト水槽を用い石英管ヒーターで水温約22℃に設定した。試験区は5区設けた。1区は濃縮凍結クロレラの溶液を静置し沈殿を作ったもの（約36時間で100%が沈殿する）、2区は1区と同様にした溶液50%に濃縮凍結クロレラ溶液50%を加えたもの、3区は1区と同様の溶液50%に生クロレラ50%を加えたもの、4区は濃縮凍結クロレラ溶液100%、5区は生クロレラ100%とした。各区とも接種時以外は無給餌とし、弱い通気で4日間培養とした。また、ワムシ接種濃度は100個体/mlとした。

#### 4) 期間

昭和61年10月20日～11月1日

### 〔結果と考察〕

培養結果を表1、図1に示した。1回目の実験で良好な増殖をしたのは5区だけであり、4区は2日目に167.72%と5区よりも高い増殖率を示したが、その後減少した。1区、2区、3区は1日目から減少し、4日目には、ほぼ全滅した。弱通気のためか、1区、2区、3区では沈殿物が1日目には白く腐敗し、また、4区でも3日目に同様の現象が見られた。この時のpHを見ると、セット時に1～5区はpH7.27～8.22であったのが、1～3区は1日目にpH4.25～4.76に、4区は3日目に5.01と酸性化しており水質の悪化が見られた。2回目の実験では、5区は増殖し、4区でも1回目よりも減少傾向がゆるやかであった。1区は1日目から、2区、3区では2日目から急減し、4日目には、ほぼ全滅した。2回目の実験では1回目より通気を強くして行ったためか、1区では1日目より沈殿物が白濁したが、2区と3区では1日目は白濁せず、2日目より白濁した。4区では4日目にやや白濁した。この時のpHは、セット時に1～5区がpH7.42～8.17、1日目の1区がpH5.25、2日目の2区と3区が

pH 4.82とpH 4.90、4日目の4区がpH6.27と酸性化している。したがって、濃縮凍結クロレラをワムシ培養の餌料に用いる時、ワムシが1日目で摂餌してしまうだけの量を用い、通気を充分に行い、沈殿物の腐敗による水質の悪化を防ぐ必要がある。

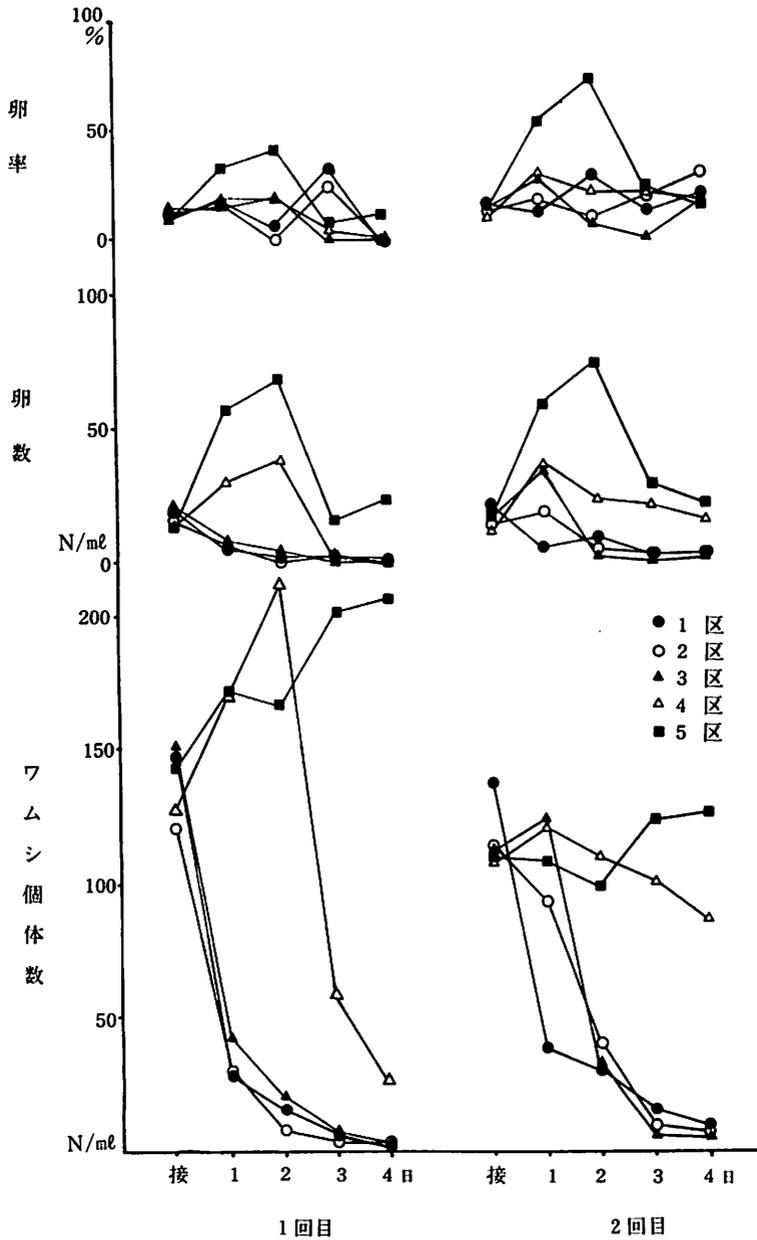


図1 濃縮凍結クロレラを用いたワムシ培養結果

表1. 濃縮凍結クロレラを用いたワムシ培養結果

区	1 回 目					2 回 目				
	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
セット時	147(19)	121(14)	151(21)	127(13)	143(13)	138(21)	114(14)	112(15)	108(12)	110(13)
1日目	29(5)	30(5)	43(7)	170(30)	171(56)	39(5)	93(18)	124(34)	121(36)	108(58)
2日目	16(1)	8(0)	21(4)	213(38)	166(68)	31(9)	41(4)	34(2)	110(23)	99(73)
3日目	6(2)	4(1)	6(0)	59(2)	201(15)	16(2)	10(2)	6(0)	101(21)	123(28)
4日目	2(0)	3(0)	3(0)	27(0)	206(23)	10(2)	7(2)	6(1)	86(15)	126(21)
増殖率 注1	-98.64%	-97.52%	-98.01%	最大167.72% -78.74%	144.06%	-92.75%	-93.86%	最大110.71% -94.64%	最大112.04% -20.37%	114.55%
水温 最高～最低	平均22.04℃ 21.6～22.6℃					平均21.82℃ 21.4～22.3℃				

注1. 接種時より減少した場合は4日目で増殖した場合は最大値を、途中で増えて減少した時は最大値と4日目。

### Ⅲ 供試クロレラのワムシ餌料としての効果

#### 共通課題（クロレラ）

ワムシの培養に適したクロレラの種を得るため、昭和60年度より共通課題として各種クロレラの特性を比較検討し、すでに当场では冬期の培養試験と一定条件下での培養試験ならびにクロロフィル $\alpha$ 含量測定などの試験を行った。本年度はこれらのクロレラを用いてワムシ培養試験を行い、クロレラの実用性を比較した。

#### 〔材料と方法〕

##### 1) 供試クロレラ

養殖研究所より入手し9月まで保存培養したクロレラと、当场で使用しているもの（対照）を用いた。クロレラ海水の比重は、1.0245、1.0260であった。

##### 2) 供試ワムシ

実験Ⅱと同じL型ワムシを用いた。

##### 3) 試験区の設定

実験は30ℓポリカーボネイト水槽を用い石英管ヒーターで水温約22℃に設定した。試験区は4区設けた。ワムシ接種時の餌料を1-1区と1-2区は石川増試クロレラ（対照）、2-1区と2-2区では養殖研クロレラとし、各区のクロレラ濃度は約2000万セル/mlとなるようにした。また、接種後の餌料は、ワムシ100万個体に対し1.5gのパン酵母を1日数回に分けて補給し、4日間の培養を行った。なお、ワムシ接種濃度は各区とも50個体/mlとした。

##### 4) 期間

昭和61年9月29日～10月18日

#### 〔結果と考察〕

ワムシ培養結果を表1、図1に、背甲長を図2に示した。1回目の実験での増殖率は254.4～270.9%であり、1-1区>2-2区>1-2区>2-1区、2回目の実験での増殖率は184.3～192.2%であり、2-2区>2-1区>1-1区>1-2区>、3回目での増殖率は108.0～175.0%で2-1区>1-1区>2-2区>1-2区の順に高かった。すなわち、1回目の実験と2回目の実験において増殖率、卵数に大きな差はなかったが、3回目の実験で2-1区が増殖率が特に高かった。

次に、ワムシの背甲長を見ると、実験開始前（平均271.0 $\mu$ ）、1-1区および1-2区（平均271.2 $\mu$ ）、2-1区および2-2区（平均271.8 $\mu$ ）とも大きな差は見られなかった。

以上のことから、ワムシ植え継ぎ培養法では、養殖研クロレラと石川増試クロレラは、ほぼ同様に使用することが可能であると推察される。今年度、養殖研株のクロレラの大量培養を行う予定であったが、1トン以上になると枯死することが多く、その原因は不明であった。

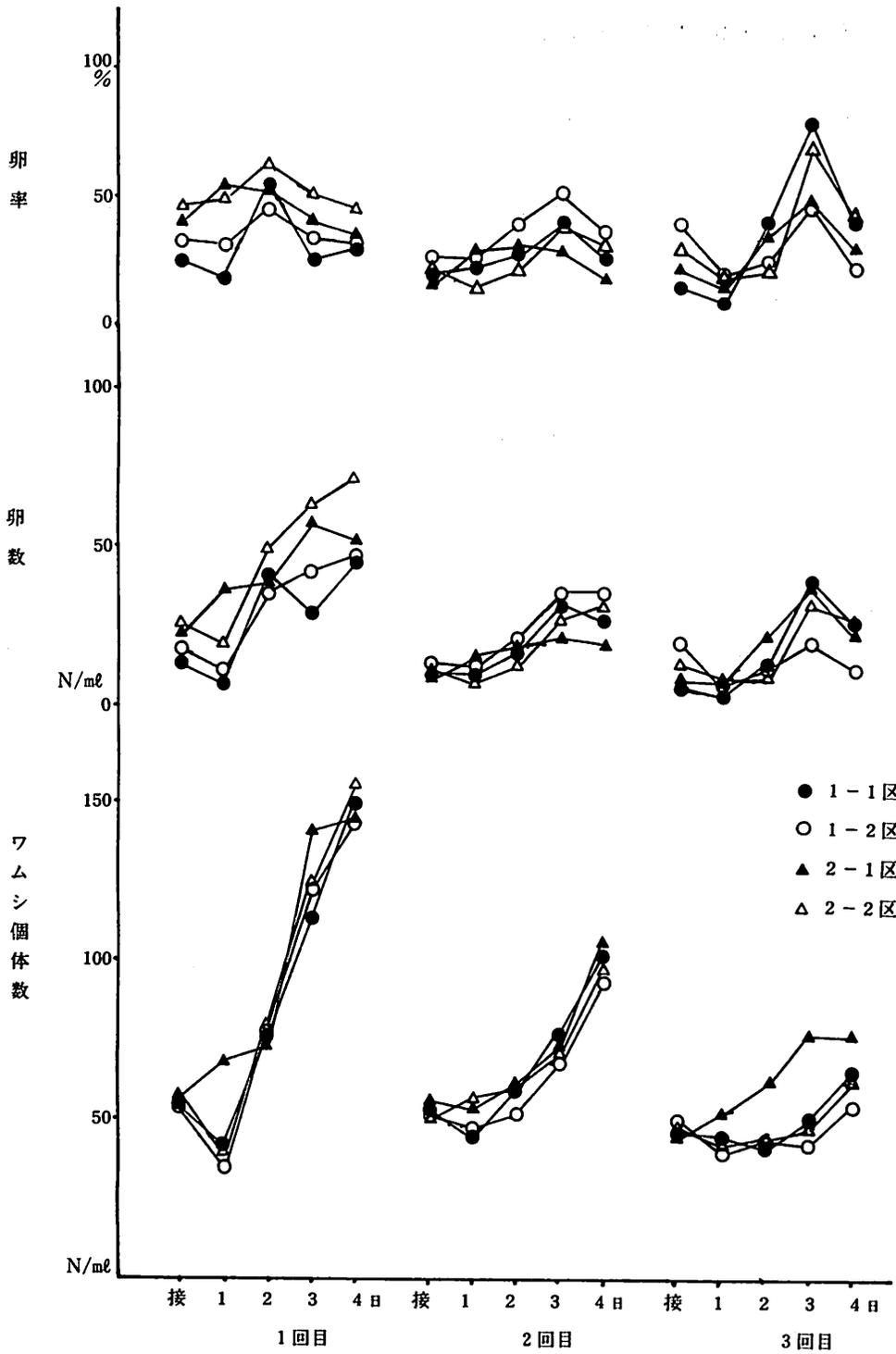


図1 養殖研および石川増試クロレラを用いたワムシの増殖

表1. 養殖研クロレラおよび石川増試クロレラを用いたワムシの増殖

	1 回 目				2 回 目				3 回 目			
	石川増試クロレラ		養殖研クロレラ		石川増試クロレラ		養殖研クロレラ		石川増試クロレラ		養殖研クロレラ	
区	1-1	1-2	2-2	2-2	1-1	1-2	2-1	2-2	1-1	1-2	2-1	2-2
セット時	55 (14)	55 (18)	57 (23)	58 (27)	53 (10)	51 (14)	56 (10)	51 (12)	45 (7)	50 (20)	44 (8)	46 (14)
1日目	40 (7)	35 (11)	68 (37)	40 (20)	45 (10)	47 (13)	54 (16)	57 (9)	44 (4)	40 (8)	52 (8)	42 (8)
2日目	76 (42)	77 (36)	73 (39)	78 (50)	58 (18)	52 (21)	61 (20)	59 (14)	41 (12)	43 (11)	62 (22)	43 (10)
3日目	113 (29)	122 (42)	140 (58)	124 (64)	77 (32)	68 (36)	73 (22)	72 (28)	50 (40)	42 (20)	77 (38)	47 (33)
4日目	149 (45)	143 (47)	145 (52)	156 (72)	101 (27)	94 (36)	107 (20)	98 (32)	65 (27)	54 (12)	76 (22)	62 (27)
増殖率	270.9%	260.0%	254.4%	269.0%	190.6%	184.3%	191.1%	192.2%	144.4%	108.0%	175.0%	134.8%
水温 最高～最低	22.72℃ 24.8～21.8℃				22.6℃ 24.0～21.8℃				22.6℃ 24.0～22.0℃			

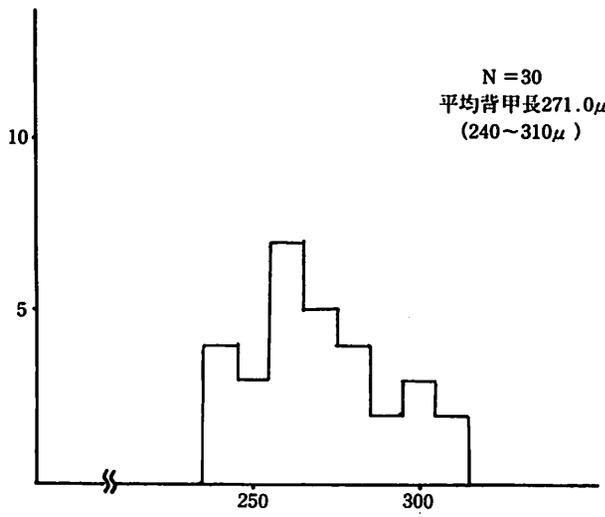


図2-1 実験開始前ワムシ背甲長

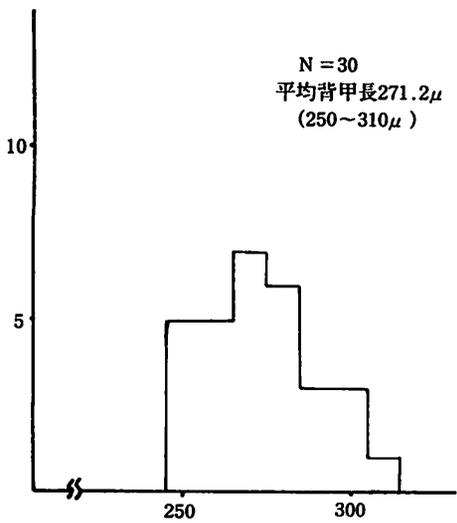


図2-2 石川増試クロレラを餌料としたワムシ背甲長

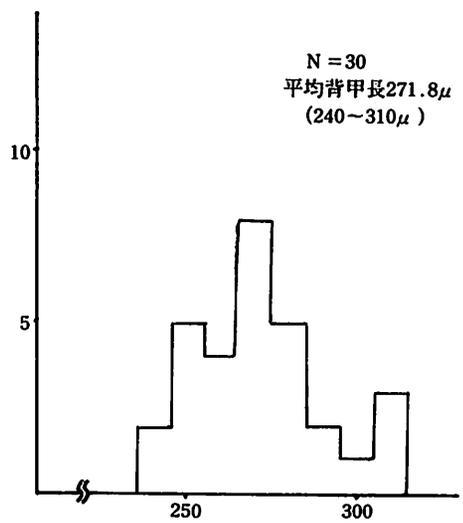


図2-3 養殖研クロレラを餌料としたワムシ背甲長

# 昭和56～61年度研究結果の概要

## 〈自由課題〉

### 1 L型ワムシの摂餌量 (57年度)

L型ワムシの摂餌量は、水温20℃の条件下で24時間に1個体当たり、クロレラで平均12.13万セル、パン酵母で平均20.50万セル、テトラセルミスで平均0.60万セルであった。

### 2 L型ワムシの産仔数および生存日数 (56年度・59年度・60年度)

#### 1) 水温別産仔数・生存日数 (56年度)

海産クロレラで培養したL型ワムシの産仔数は、15℃で20～26個体、20℃で21～25個体、25℃で23～26個体、30℃で10～18個体であり、生存日数は、15℃で14～16日間、20℃で9～10日間、25℃で7日間、30℃で6～7日間であった。

水温を15～25℃に設定し海産クロレラで培養したL型ワムシは、ほぼ一定数の産仔を行い、水温の上昇に伴い産仔が早まり生存日数が短くなった。

#### 2) 餌料別産仔数・生存日数 (59年度・60年度)

水温20℃の条件下でのL型ワムシの餌料別産仔数および生存日数は、59年度では海産クロレラで培養したL型ワムシの産仔数は平均20.55個体、生存日数は平均14.30日間であり、60年度では産仔数は平均21.00個体、生存日数は平均15.33日間であった。59年度にテトラセルミスで培養したL型ワムシの産仔数は平均21.50個体、生存日数は平均12.35日間であり、60年度に濃縮凍結クロレラで培養したものはそれぞれ平均20.73個体、平均14.83日間であった。

水温20℃の条件下で海産クロレラで培養したL型ワムシの産仔数、生存日数と濃縮凍結クロレラでのそれらとの差は小さかったが、テトラセルミスで培養したものは産仔数は多く、生存日数は短くなった。

### 3 テトラセルミスについて

#### 1) 混合培養 (57年度・61年度)

テトラセルミスと海産クロレラを混合培養すると、テトラセルミスは増殖し、海産クロレラは減少し、最後にはテトラセルミスのみが残った。

テトラセルミスと石川増試株の海産クロレラでは色素組成が異なっていた。特にクロロフィルbはテトラセルミスにのみ存在し、海産クロレラには含まれていなかった。

#### 2) 水温別増殖 (58年度)

15℃、20℃、25℃、30℃の各水温でのテトラセルミスの培養比較試験では増殖率に大きな差はみられなかった。

#### 3) 水深別増殖 (59年度)

3段階の水深でテトラセルミスの培養を行い、照度と増殖の関係を調べた結果、浅い水深すなわち単位容量当たりの受光量が多いほど増殖率が高かった。

#### 4) テトラセルミス濃度と光合成色素の関係 (60年度)

テトラセルミスの濃度とクロロフィル<sub>a</sub>含量には密接な関係がみられ、テトラセルミスの増殖に伴いクロロフィル<sub>a</sub>も増加した。

5) テトラセルミス給餌によるL型ワムシへの影響 (59年度)

L型ワムシをテトラセルミスで培養した場合、世代交代が早くなり大型化した。

4) ワムシ餌料としての濃縮凍結クロレラ (59年度・60年度・61年度)

1) 濃縮凍結クロレラを用いてのL型ワムシ培養 (59年度・60年度)

濃縮凍結クロレラを単独あるいは海産クロレラと併用した方が、パン酵母と併用した時より、L型ワムシの増殖率は、高かった。

2) 沈殿物のL型ワムシの増殖への影響 (61年度)

沈殿の比率を変えた濃縮凍結クロレラ溶液を用いたL型ワムシの培養では、沈殿物が多いものほど増殖が不良であったが、これは沈殿物が腐敗することによるものと思われた。

<共通課題>

1) 系統別ワムシの増殖特性 (57年度・58年度・59年度)

1) L型ワムシとS型ワムシとの間の移行の有無 (57年度)

養殖研より入手したL型ワムシを培養した結果、S型ワムシへの移行はみられなかった。

2) 水温別増殖特性 (59年度)

L型ワムシとS型ワムシの20℃、24℃、28℃の各水温での実験培養では、L型ワムシは24℃で、S型ワムシは28℃で最も高い増殖率を示した。

2) 海産クロレラについて (60年度・61年度)

1) 冬期における増殖 (60年度)

養殖研株と石川増試株の海産クロレラの冬期培養(水温5.6~9.8℃)では、養殖研株の方が増殖で優れていたが、クロロフィル<sub>a</sub>含量は低かった。

2) ワムシ餌料としての効果比較 (61年度)

養殖研株および石川増試株の海産クロレラでのワムシ培養では、増殖率、背甲長とも差は見られなかった。