

有用藻類バイオテクノロジー基礎技術開発研究

玉城 信・長谷川 毅彦*

1. 目的

本県の有用藻類についてのバイオテクノロジーに関する基礎的なデータの収集を目的に従来本研究を行ってきた。シャコガイ種苗生産時において初期稚貝の生残に大きく影響を及ぼすシャコガイ共生藻 (*Gymnodinium* sp.) を有用藻類と位置づけその培養方法に検討を加える。

シャコガイの種苗生産において最も大きな減耗期は初期殻頂期仔貝と共生藻との共生関係が成立する時期である。共生藻の培養手法が確立されていない現状では多くの成貝を犠牲にし、その外套膜より取り出した共生藻を仔貝に投与しているが、常に良好な状態の共生藻の投与はできていない。そのため共生藻の培養技術の確立が種苗生産現場で必要とされてきた。

今年度は共生藻培養試験の前提となる培養藻体の計数方法に検討を加える。

2. 材料及び方法

シャコガイ種苗生産現場においては従来シャコガイ成貝の外套膜を切り取って濾過海水と共にミキサー等ですりつぶし共生藻を取り出し、P-E S 改変培地の中にその濃厚な共生藻液を元種として入れ3ℓ及び5ℓフラスコで4～5日通気培養し、シャコガイ飼育水槽に投与している。しかし、適正な培養条件(温度、照度、培地組成等)の検討はなされていない。通気培養フラスコ内の共生藻の殆どは付着珪藻等と同様にガラス壁に付着し一部は浮遊している。シャコガイ仔貝に共生藻を投与するために培養液を血球計算盤で計数する場合、従来の手法(スカッチブライト等で剥ぎ落としピペットで攪拌)では共生藻は群体を成しており正確な計数は不可能であった。飼育水槽に投与する目的だけの場合はフラスコ単位

で投与するため従来手法でも給餌そのものは可能であった。しかし、今後培養条件の検討を行う際には、これまでの計数方法では正確に細かい条件の検討はできない。

本研究では共生藻を含む培養液サンプルの攪拌方法に検討を加え、より精度の高い攪拌方法を開発する。

今回は培養条件そのものの試験ではなく、培養液の攪拌方法の検討であるため攪拌サンプルを得るための培養方法は以下に記した従来手法で行った。

- 1) 培養器: 1ℓ平底フラスコ(ガラス管通気)
- 2) 培養温度: 恒温培養室(28℃～32℃)
- 3) 培養照度: 6,000～7,000Lux(8:00～20:00、12時間蛍光灯照射)
- 4) 海水: 超精密濾過海水(0.01μmカット)
- 5) 元種: ヒメジャコ及びヒレジャコ外套膜より取り出した共生藻
- 6) 培養日数: 2日～13日
- 7) 培養濃度: 12万～775万cells/ml
- 8) ノリマックス、ビタミンミックス、L-シスチン、ストレプトマイシン硫酸塩を各1ml/海水1ℓ

表1にサンプル攪拌方法を示した。

1つのサンプルに対して計数は血球計算盤(改良ノイバウエル2面タイプ)3個を用いて計6面の計数を行いその6つの計数値¹⁾の平均値と母標準偏差を算出した。攪拌精度の判断は母標準偏差の平均値に占める比率で行った。つまり、

(計数値のバラツキ) = 母標準偏差 / 平均値 × 100
で表し、この(計数値のバラツキ)がより小さい方法が精度が高い攪拌方法であると判断した。各攪拌方法のサンプルの(計数値のバラツキ)の平均値及び範囲を比較してより精度の高い攪拌方法を決定する。

*非常勤職員

3. 結果及び考察

攪拌方法別計数値のバラツキを表2及び図1に示した。従来手法であるA：手振りはバラツキの幅が大きく平均49.3%で最も精度が悪い事がこの結果からも判明した。B：ブレンダーの平均はA：手振りよりも小さいが幅が大きく従来使用した家庭用ミキサーの能力を超えていないと思われた。D：ガラスホモジナイザーはC：ブレンダーの処理の後に行った手法にも係わらず平均、幅の両方でC：ブレンダーよりも悪い結果であった。5つの方法の中でC：ブレンダーとE：ミキサー付テフロンホモジナイザーの2つの結果が良好であったが若干E：ミキサー付テフロンホモジナイザーの結果が優れている。しかもブレンダーは機械の性能の上からこれ以上連続作動時間を延ばせない欠点があるがミキサー付テフロンホモジナイザーの場合は作動時間の延長が可能であることから更にバラツキを小さくできる可能性がある。

以上の結果から今後の計数時の攪拌はE：ミキサー付テフロンホモジナイザーの方法を用いることとした。

4. 要約

- ・シャコガイ共生藻の培養技術の確立が種苗生産で必要とされているが培養試験は行われていない。
- ・培養試験を行う前提条件として計数方法の検討

が必要である。

- ・培養密度の計数のためには均一な攪拌方法が重要となる^{1,2)}。
- ・5つの攪拌方法の検討を行った結果、手振り後ブレンダーで攪拌し、更にミキサー付テフロンホモジナイザーを用いた攪拌方法が最も精度が高いことが解った。

5. 今後の課題

- ・ミキサー付テフロンホモジナイザーを用いた攪拌方法の更なる改良を行い計数精度を更に高める。
- ・計数方法の確立後、共生藻培養条件の検討を早急に行う。
- ・次年度から特定研究開発促進事業「生物餌料の培養技術に関する研究」でシャコガイ共生藻を取り上げる。そこでは主にヒメジャコとヒレジャコの共生藻についての研究を行う予定であるので本研究ではヒレナシジャコの共生藻を対象に研究を行う。

文献

- 1) 佐々勤 (1965) : 生育生理. 藻類実験法 (田宮博・渡辺篤編), 南江堂, 東京, pp185-190.
- 2) 石居進 (1975) : 生物統計学入門. 培風館, 東京, pp59-64.

表1 共生藻計数のためのサンプル攪拌方法

記号	攪拌方法名称	サンプル攪拌方法の具体的説明
A	手振り	培養器(1ℓ平底フラスコ)内にスカッチブライト小片(20mm×70mm)を2~3個投入し肉眼で観察してフラスコ内壁の付着物が無くなるまで手で振る。
B	ブレンダー ①	A方法終了後のサンプル100mℓを超精密濾過海水で5倍に希釈し500mℓとした後、それをブレンダー(PHOENIX BLENDER 型KB-1: 18,500回転/分)にセットした1,000mℓガラスボトルに入れ3~15分作動する。
C	ブレンダー ②	A方法終了後のサンプル100mℓをブレンダー(PHOENIX BLENDER 型式KB-1: 18,500回転/分)にセットした200mℓガラスボトルに入れ3~9分作動する。
D	ガラスホモジナイザー	C方法終了後のサンプルからピペットで10mℓ抜き取り、ダウンス型ガラスホモジナイザー(15mℓ用)に入れ10~30分手動で攪拌する。
E	ミキサー付テフロンホモジナイザー	C方法終了後のサンプルからピペットで5~20mℓ抜き取り、テフロンホモジナイザー(20mℓ用)とテフロンホモジナイザー用ミキサー(190回転/分)を組み合わせて3~13分手動で攪拌する。

表2 攪拌方法別計数値のバラツキ

攪拌方法	サンプル数	母標準偏差 / 平均値 × 100 (%)	
		平均	範囲
A	10	49.3	12.8 ~ 94.3
B	88	32.5	4.2 ~ 100
C	33	19.7	9.7 ~ 30.4
D	11	24.6	11.5 ~ 46.6
E	31	18.1	3.7 ~ 32.8

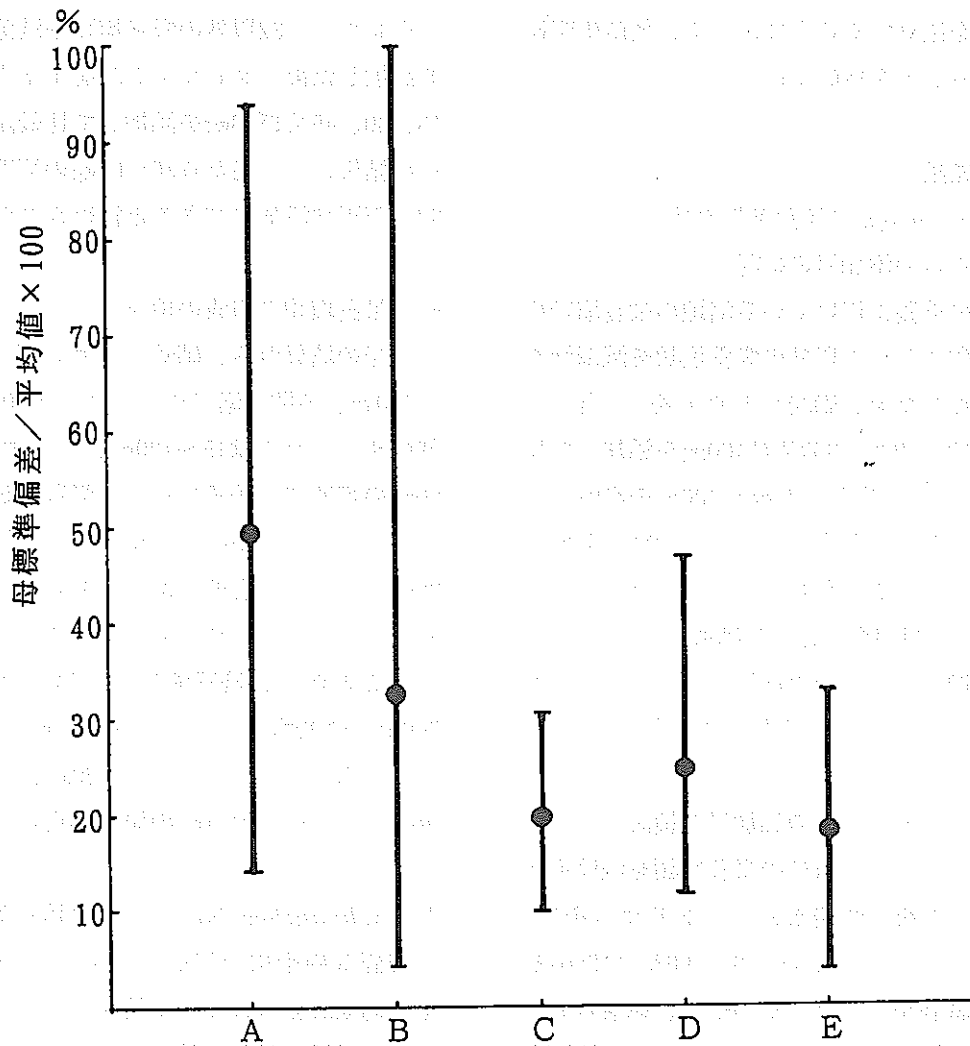


図1 攪拌方法別計数値のバラツキ