

生物餌料の培養技術に関する研究 (要約)

玉城 信・池之内晴美*

本研究の詳細は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報告書において水産庁に報告し、報告書は別途に印刷するので、ここではその概要のみを記す。

1. 目的

本県の採貝漁業の重要種であるシャコガイ類の種苗生産時における最も大きな減耗期は、初期殻頂期仔貝と共生藻 (*Symbiodinium sp.*) との共生関係が成立する時期である。現状では共生藻の培養手法が確立されていないため多くの成貝を犠牲にし、その外套膜から取り出した共生藻を仔貝に投与しているが常時良好な状態の共生藻を投与できていない。本研究では共生藻の保存、拡大培養条件の検討及び形態変化の機構解明を行うことにより、共生藻の培養条件を確立し種苗生産技術の高度化を図る。

2. 材料及び方法

(1) 初代培養条件の検討

元種となる共生藻は当八重山支場で過年度に種苗生産したヒレジャコ 3 貝～6 年貝(殻長170～270mm)の外套膜より取り出した。外套膜の表皮(共生藻が主に含まれる)の部分を解剖バサミで薄く剥ぎ、洗浄後、超精密濾過海水(0.01 μ m中空糸膜で処理)1,000mlと共にミキサー(11,000回転/分)に入れ粉碎し、灰汁を除き元種原液とした。培養には全てこの超精密濾過海水を用いた。平底フラスコ(500ml及び1,000ml)を用い恒温培養室(28～33°C)で通気培養試験を行なった。培地は主にP-ES改変培地を使用した。蒸発した水分は毎日滅菌蒸留水で補った。恒温培養室の蛍光灯は8:00～20:00までの12時間照射とし、設置した翌日を培養1日目とした。共生藻の増殖状態は1～5日おきに細胞数を把握した。共生藻は培養すると主に培養容器内ガラス

面に付着する細胞が多いため計数をする際には、容器内に滅菌したスコッチブライト小片(10×50mm)を2～3個投入して振り回し壁面に付着した共生藻を剥ぎ落とした。次に培養液100mlをブレンダー(18,500回転/分)で1分間攪拌した後、更にジェネレーションホモジナイザー(25,000回転/分)を用い1分間再攪拌した。試料を血球計算盤で各試験区毎に6回計数し、平均値をその細胞密度とした。

初代培養試験は5回行い以下に試験設定を記す。

- 1) 照度: 5,000Lux、7,000Lux、10,000Lux
- 2) 元種密度: 40×10⁴cells/ml、50×10⁴cells/ml、60×10⁴cells/ml
- 3) 塩分濃度及び元種密度: 34‰、40×10⁴cells/ml、36‰、40×10⁴cells/ml、34‰、50×10⁴cells/ml
- 4) 塩分濃度: 40‰、34‰、30‰
- 5) 塩分濃度: 34‰、30‰、25‰

(2) 保存培養条件の検討

高細胞密度(100×10⁴cells/ml以上)での保存培養試験を行った。培養容器は500ml三角フラスコ(水量300ml)を使用した。植え継ぎは、計数日毎に抜き取った1/3量分の培地を添加した。照度は100～200Luxで培養した。培地はP-ES改変培地を使用した。細胞密度の計数は初代培養と同様に行い、正常な形や色をしている細胞のみ(従来の保存培養試験においては細胞の生死のみを観察した)を計数した。

保存培養試験は2回行い、培養方法等を以下に記した。

- 1) 初代培養後に通気を停止し、培養15日目まで静置した元種を振盪培養開始した。
- 2) 初代培養後に通気を停止した元種を振盪培養開始した。試験開始密度は207×10⁴cells/mlと350

*: 嘱託職員

×10⁴cells/mlの2種類とした。

(3) 継代培養条件の検討

高細胞密度 (100×10⁴cells/ml以上) での保存培養試験の好結果を応用した保存元種からの継代培養試験 (通気培養) を行った。培養容器は500ml三角フラスコ (水量300ml) を使用した。植え継ぎは、計数日毎に抜き取った1/3量分の培地を添加した。照度は5,000Luxで培養した。細胞密度の計数は初代培養と同様に行い、健全な形や色をしている細胞のみ (従来の保存培養試験においては細胞の生死のみを観察した) を計数した。

継代培養試験は2回行い、培養方法等を以下に記した。

1) 初代培養後に通気を停止し、振盪培養を12日間行い元種とした。試験開始密度は339×10⁴cells/mlとした。培地はP-ES改変培地を使用した。

2) 初代培養後に通気を停止し、振盪培養を23日間行い密度調整後、元種とした。

培地及び試験開始密度は以下の3区とした。

40×10⁴cells/ml (P-ES改変)

80×10⁴cells/ml (P-ES改変)

40×10⁴cells/ml (ESM)

(4) 運動型細胞への変異条件の検討

前年度の試験結果から運動型細胞が光刺激によって出現することが判明した。今年度は更に光刺激 (照度、照射時間) についての試験を行った。総細胞密度に占める運動型細胞の比率を出現率として表した。試験期間は9:00~翌日13:00の間2時間置きに28時間観察した。

運動型細胞観察試験は3回行い以下に方法等を記した。

1) 照明時間は8:00~20:00 (12時間) とした。

照度は5,000Luxとした。培養履歴及び試験開始密度は以下の3区とした。

1,000Luxで振盪培養7日間、97×10⁴cells/ml

5,000Luxで継代培養7日間、78×10⁴cells/ml

5,000Luxで初代培養7日間、116×10⁴cells/ml

2) 5,000Luxで7日間初代培養した細胞を試験に

用いた。照明時間は8:00~20:00 (12時間) とした。試験開始密度は116×10⁴cells/mlとした。照度は12,000Lux、5,000Lux、2,000Luxの3区とした。

3) 初代培養終了後に通気停止し、1,000Luxで52日間振盪培養した細胞を計数後、密度調整して試験に用いた。試験開始密度は179×10⁴cells/mlとした。照度及び照明時間は以下の3区とした。

5,000Lux、8:00~20:00 (12時間)

5,000Lux、8:00~20:00 (12時間)

翌日10:00より照明開始し、暗期14時間

2,000Lux、8:00~8:00 (24時間)

翌日8:00より照度を5,000Luxに上げ、暗期無し

(5) 共生藻種類の検討

シャコガイの共生藻はシャコガイの種類によって異なる種特異的なものか、或いは同一のものなのかを推測するための一つの試みとして種類の異なるシャコガイ初期仔貝 (共生成立する前) に対して他の種類の外套膜より取り出した共生藻を投与して共生成立の有無を観察する試験を行った。4回行った試験は全て同一の方法で行った。シャコガイ採卵翌日に孵化した幼生を収容した飼育水槽をコンタミが起こらないように透明ビニールシートで覆い、別種のシャコガイの共生藻を日令2から試験終了するまで投与し続けて、通常の一種類の共生藻を投与した区と比較した。通常共生成立は日令20頃までに終了するが、生残している初期仔貝の全てが完全に共生成立するまで試験を継続した。共生藻の投与量は飼育水1ml当たり30細胞以上になるように定法で行った。換水等、他の飼育手法も通常の種類生産と同様に行った。

4回の試験設定を以下に記す。

1) 仔貝種類: ヒレジャコ

共生藻種類: ヒメジャコ及び対照区 (ヒレ)

飼育水槽及び収容数: 各区共500l、2万個体
計数日令: 33

2) 仔貝種類: ヒメジャコ

共生藻種類: ヒレジャコ及び対照区 (ヒメ)

飼育水槽

及び収容数：ヒレジャコ 5 kℓ、150万個体

対照区 5・10kℓ、1,060万個体

計数日令：23

3) 仔貝種類：ヒメジャコ

共生藻種類：ヒレジャコ及び対照区（ヒメ）

飼育水槽及び収容数：各区共500ℓ、2万個体

計数日令：44

4) 仔貝種類：ヒメジャコ

共生藻種類：ヒレジャコ及び対照区（ヒメ）

飼育水槽及び収容数：各区共500ℓ、15万個体

計数日令：30

3. 結果及び考察

(1) 初代培養条件の検討

5回の試験結果から照度は5,000Luxの方が7,000Luxよりも安定的な増殖が見られ、最適照度といえた。元種密度は 40×10^4 cells/mlと 50×10^4 cells/mlに大きな差はなかった。しかし、効率的な増殖手法を選択すると元種密度は 40×10^4 cells/mlが適していると考えられた。共生藻は25~40%の塩分濃度の範囲で増殖可能である。しかし、培養は通常の海水(34%)で十分である。

(2) 保存培養条件の検討

2回の試験結果から照度100~200Lux、継代間隔5~10日、2/3量の元种植え継ぎの条件の振盪培養で高密度の保存培養が可能であることが明らかになった。

(3) 継代培養条件の検討

2回の試験結果から保存培養した元種を用いて継代培養（通気二代目以降）を行うことは可能であることが判明した。その際の元種密度は初代培養時よりも高い細胞密度が必要であることも示唆された。

(4) 運動型細胞への変異条件の検討

3回の試験結果から運動型細胞は保存培養においても出現するが、出現率は初代培養、継代培養に比べて低いことが解った。運動型細胞出現のために光は刺激になるがその照度は、2,000Luxで十分であ

り、10,000Luxは光刺激としては高すぎることを解った。暗期を通常よりも長くすると、運動型細胞が出現しやすいことも示唆された。

(5) 共生藻種類の検討

4回の試験全てで別種シャコガイ共生藻との共生関係が成立した個体が生残した。対照区（同種共生藻）と比較すると全体的に共生成立個体数は少ないが別種のシャコガイ共生藻を投与しても共生し、生存している個体が確認された。しかし、この試験は大型水槽によるもので、個別のシャコガイ初期仔貝が共生関係を成立させたところを直接観察したわけではないため試験の精度に疑問が残った。今回の結果からシャコガイは、共生藻の種類が異なっても取り込むことは推察できたがそのことがシャコガイの共生藻の同一化を説明できるものではない。今後はシャコガイ間に留まらず、サンゴ等の別の生物の持つ共生藻を用いたシャコガイへの共生試験もあわせて行いたい。

4. 今後の課題

- 通気継代培養の培養条件を初代培養の条件と比較検討して明らかにする必要がある。
- 光照射刺激以外の運動型細胞の変異機構の解明を行う必要がある。
- 別種シャコガイ初期仔貝との精密な飼育試験を行う必要がある。