

I. 餌料藻類の凍結保存試験

通称海産クロレラ、テトラセルミス、およびキートセロスなどの微細藻類は魚類等種苗生産時の初期餌料（ワムシ等）の培養、および直接餌料として広く利用されている。しかし、一般に種の保存は継代培養法で行なわれており、継代途中で雑物が混入したり、温度調節の事故等で種断絶の危険性がある。また、保存株が多くなれば継代操作も繁雑になるため、種を安全で簡便に保存するため凍結保存法を検討する。

材料および方法

材料 沖縄県水産試験場八重山支場地先海域から採集し、ワムシ類の培養に使用している *Nannochloropsis* sp. (通称海産クロレラ)、農林水産省養殖研究所から分譲された *Tetrasermis tetrathele*、およびシラヒゲウニなどの種苗生産に使用している *Chaetoceros gracilis* (沖縄県栽培漁業センター由来) を用いた。

前培養 供試株をミッケル海水 (ALLEN & NELSON, 1910) に 25℃、60001×(24時間照射) で静置培養し (培養条件は以下同じ)、充分発育のみられる培養液を 3,000 r.p.m., 10 分間遠心分離して上清を捨て、滅菌海水で数回洗浄した。その後、ミッケル海水寒天平板培地上に画線培養し、細菌の汚染がないと思われる単一コロニーを再び平板培地で培養して凍結保存用の原株とした。なお、キートセロスは無菌化が充分でない。原株をミッケル海水で 3 日間培養して 2 等分し、片方は凍害防御剤としてグリセリン 10% とジメチルスルホキシド (DMSO) 5% 濃度になるように加え、無添加区とともに 24 時間培養した。凍結開始時の各株濃度は凍害防御剤添加区の *Nannochloropsis* sp. は 2.0×10^6 , *Tetrasermis tetrathele* は 2.9×10^5 , *Chaetoceros gracilis* は 9.1×10^5 , 防御剤無添加区の *Nannochloropsis* sp. は 9.7×10^5 , *Tetrasermis tetrathele* は 7.3×10^4 , *Chaetoceros gracilis* は 1.3×10^6 (細胞数/ml) である。

凍結条件 培養液 1 ml を滅菌済ポリプロピレンチューブ (12.5 × 49 mm) に分注し、その後超低温フリーザー (-70℃) に直接入れた区 (Direct 区)、4℃ で 24 時間培養後に -20℃ で保存した区、および 4℃ と -20℃ で順次 24 時間ずつ培養した後 -70℃ に凍結した区 (Step 区) の 3 区を設定した。保存期間は 1 週間、1 ヶ月、3 ヶ月、6 ヶ月、1 年間、および 2 年間で、いずれの実験区も同じ条件を 3 区設定して 3 系列の幾何平均を求めた。

融解条件と増殖力の測定 40℃ の水槽中で急速融解し、3,000 r.p.m. で 10 分間遠心分離して上清を捨て、滅菌海水で数回洗浄した。その後前培養と同じ条件で培養し、血球計算盤を用いて細胞数を測定した。

結果と考察

(1) *Nannochloropsis* sp.

凍結保存 2 年後の結果を図 1 に示す。なお、比較のため 1 年後の結果も記載する。凍害防御剤無添加区の -70℃ Direct 区は培養 10 日目頃から増殖し、1 年後の結果とほぼ類似していた。しかし、防御剤添加区では 3 例中 1 例のみに増殖性がみられ、1 年後の結果と多少変化していた。-70℃ Step 区は防御剤無添加区では 3 例中 2 例のみが増殖し、防御剤添加区では 3 例とも増

殖しなかった。これらの結果をより詳しく検討すると図2と3の通りで、 -20°C では防御剤の有無に関係なく1年以上保存した株には増殖性がみられない。また、 -70°C Direct 区の防御剤無添加区では1, 2年後ともに変化はみられないが、添加区では1年後には3例とも増殖したが、2年後では1例のみにしか増殖性がみられなかった。 -70°C Step 区の防御剤無添加区では1年後には3例とも増殖したが、2年後では2例のみに増殖が認められた。また、添加区では1年後には2例増殖したが、2年後では3例ともに増殖がみられなかった。

これらのことから -70°C 2年間凍結保存中に方法の違いで結果に相違がみられ、今後防御剤添加区およびStep区では増殖しなくなる事が予想される。

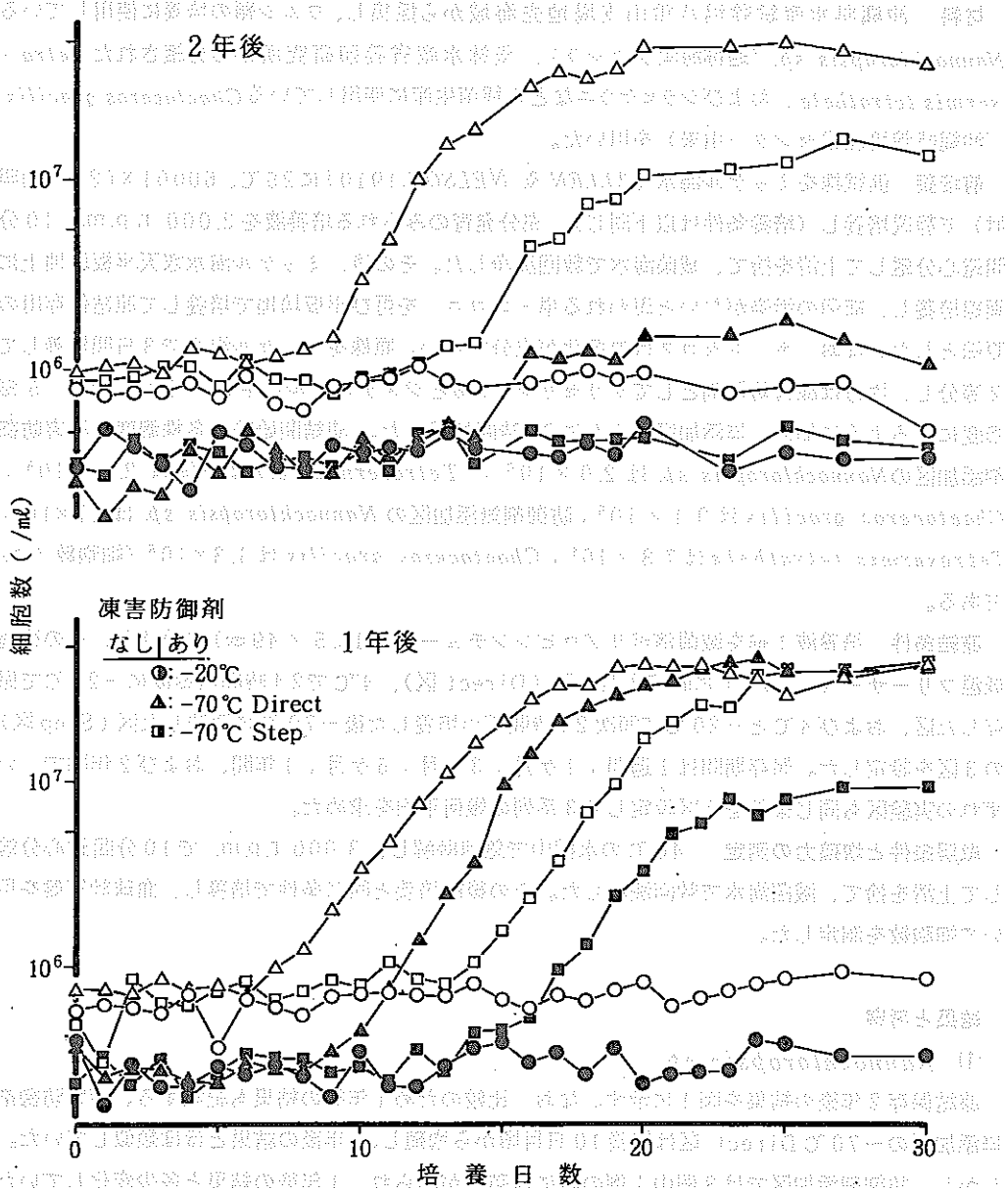


図1 *Nannochloropsis* sp. の増殖性

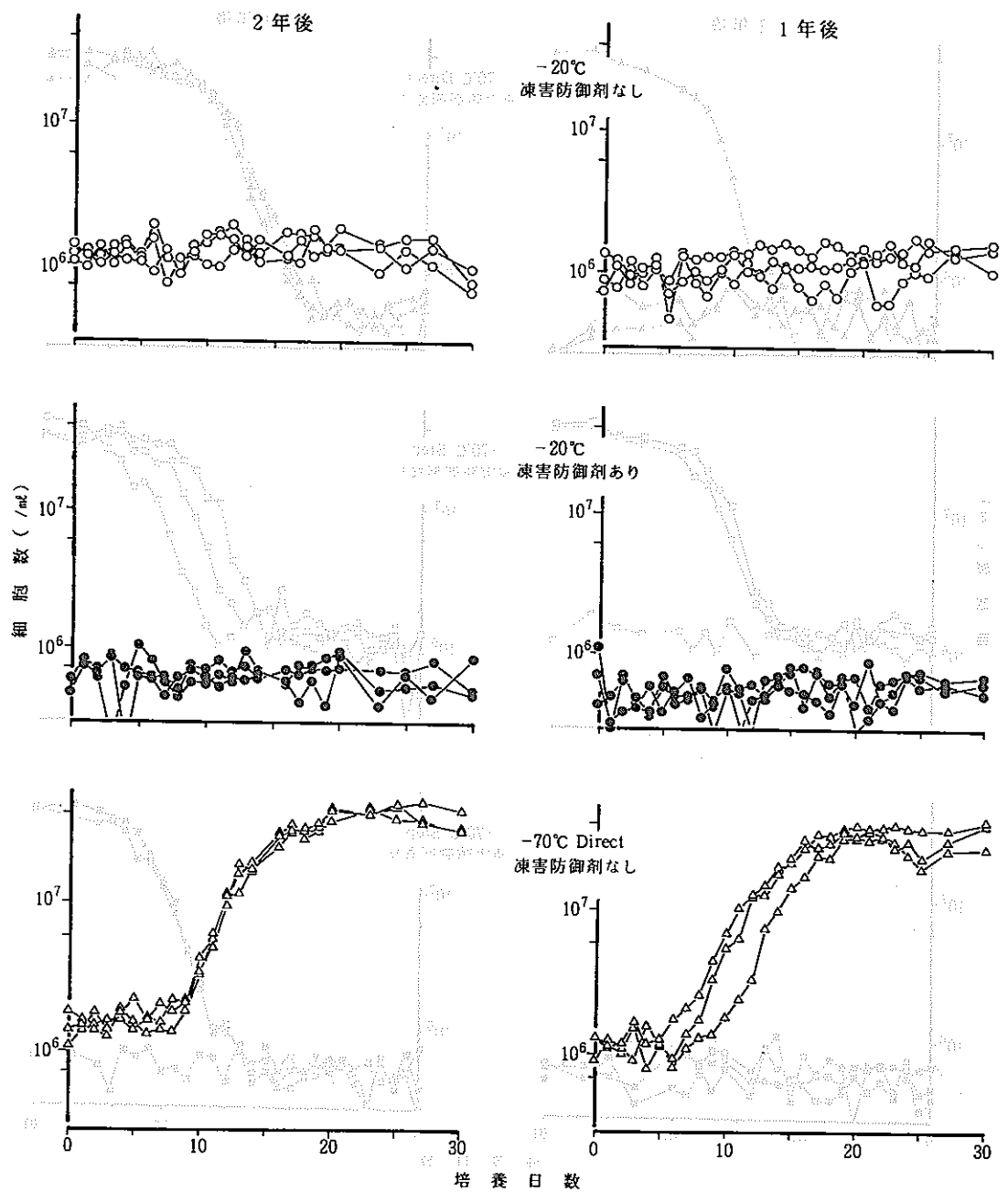
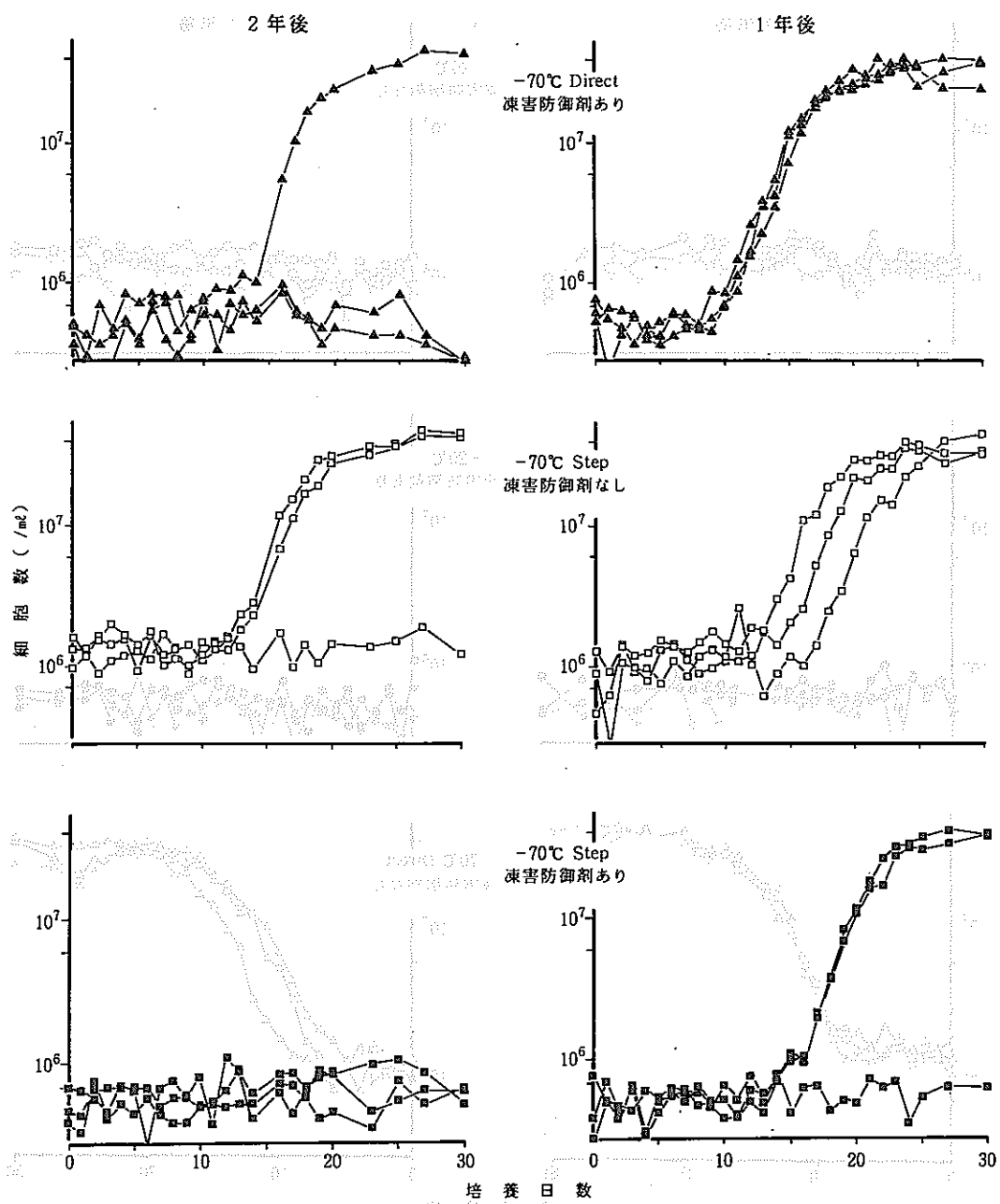


図2 *Nannochloropsis* sp.の増殖性



培養例 図3: *Nannochloropsis* sp. の増殖性

(2) *Tetraselmis tetrathele*

Tetraselmis tetrathele の凍結保存2年後の増殖性を図4に示す。結果は1年後と変化なく、 -70°C で凍害防御剤添加区のみが増殖した。ただし、増殖の開始は培養10日目頃と1年後の結果に比べて2~3日程遅れている。

(3) *Chaetoceros gracilis*

Chaetoceros gracilis の凍結保存2年後の増殖性を図5に示す。*Tetraselmis tetrathele* と同じく、 -70°C で凍害防御剤添加区のみが増殖性がみられ、1年後の結果とほぼ同じである。以上、凍結保存試験の結果を要約して図6に示す。

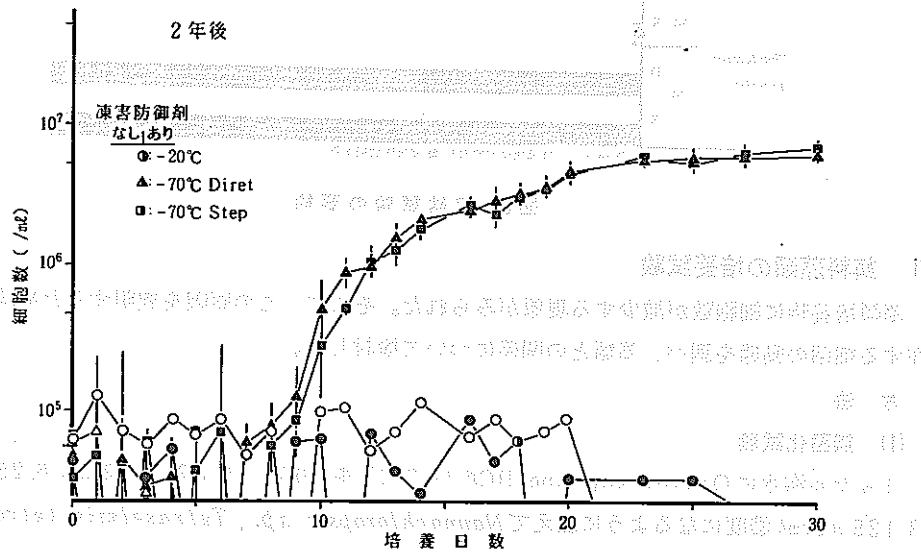


図4 *Tetraselmis tetrathele* の増殖性

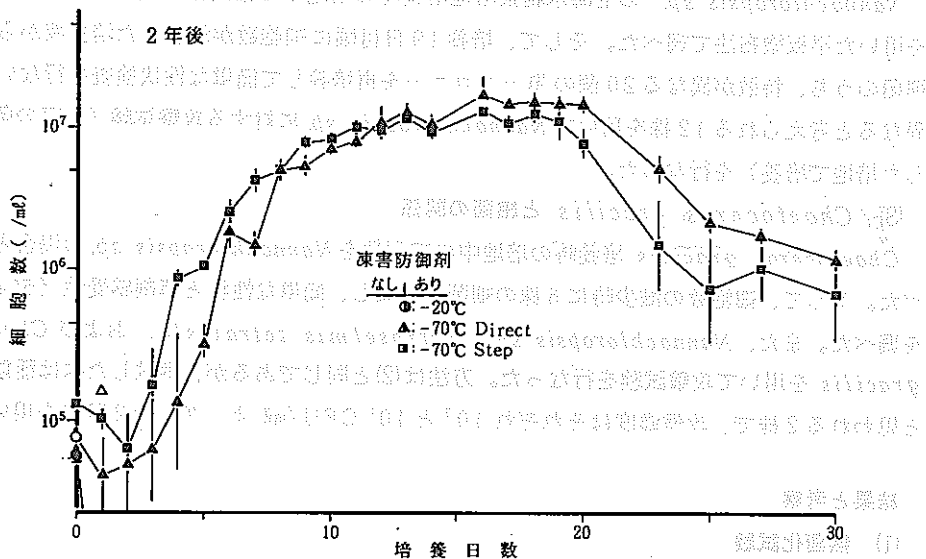


図5 *Chaetoceros gracilis* の増殖性