

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、及びキートセロスなどの微細藻類は魚類等の種苗生産時の初期餌料（ワムシ等）の培養、及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。

材料及び方法

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 *Tetraselmis tetrahele* 及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℃, 6000 lx (24 時間照射) で静置培養し (培養条件は以下同じ)、十分な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、無添加区と共に 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ナンノクロロプシスは 2.0×10^6 , テトラセルミスは 2.9×10^5 , キートセロスは 9.1×10^5 , 防御剤無添加区のナンノクロロプシスは 9.7×10^5 , テトラセルミスは 7.3×10^4 , 及びキートセロスは 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、及び 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 カ月、3 カ月、6 カ月、1 年間、2 年間、及び 3 年間で、本報では 3 年間保存した後の結果について調べた。なお、実験区は同じ条件を 3 区設定し、そ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) ナンノクロロプシス

凍結保存 3 年後の結果は図 1 ~ 3 に示すとおりである。-20℃ 保存区は総ての株が増殖しない。-70℃ (Direct) は凍害防御剤無添加区では 3 例中 3 例が、添加区では 1 例のみが増殖した。これは 2 年間保存した結果と同じであるが、防御剤無添加区では増殖の開始が培養 13 日目頃と 2 年間保存の結果に比べて 4 日程遅く、添加区では培養 18 日目頃から増殖しており、同じく 3 日程遅

くなっている。

-70°C (Step) は防御剤無添加区では3例中1例のみが増殖し、添加区では総ての株が増殖しなかった。この結果を保存2年間までの結果と比較すると、保存1年目は防御剤無添加区では3例が、2年目は2例が増殖しており、次第に増殖能力が減少する傾向にある。また、増殖の開始も保存2年目は培養13日目頃であるが、今回の結果は21日目頃と大きく遅れている。今後増殖しなくなる事が予想される。なお、防御剤添加区では保存2年目から総ての株が増殖しない。

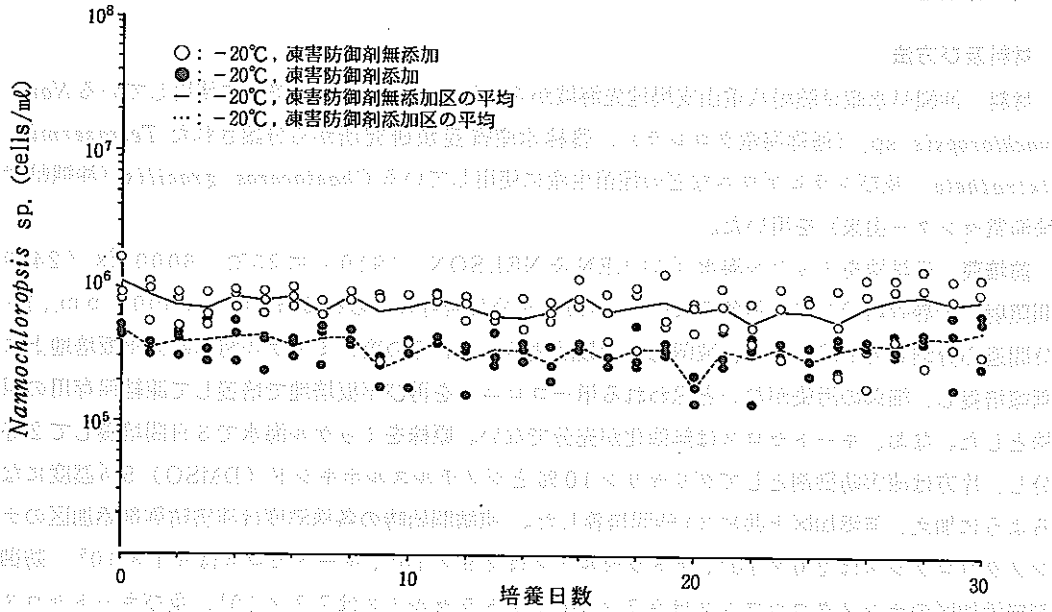


図1 ナノクロロプシス (-20°C区) の増殖性

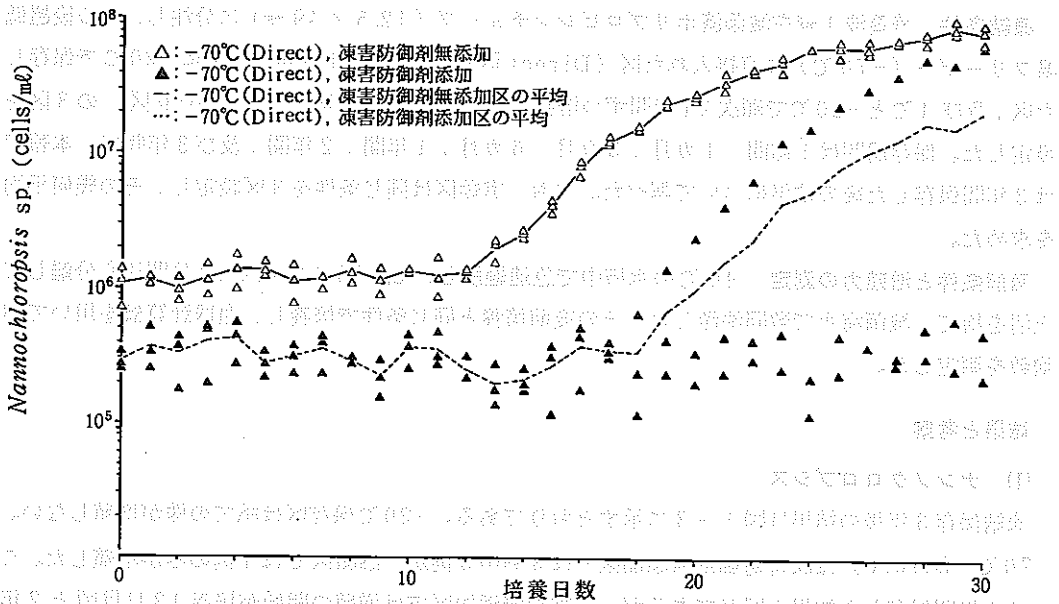


図2 ナノクロロプシス (-70°C, Direct区) の増殖性

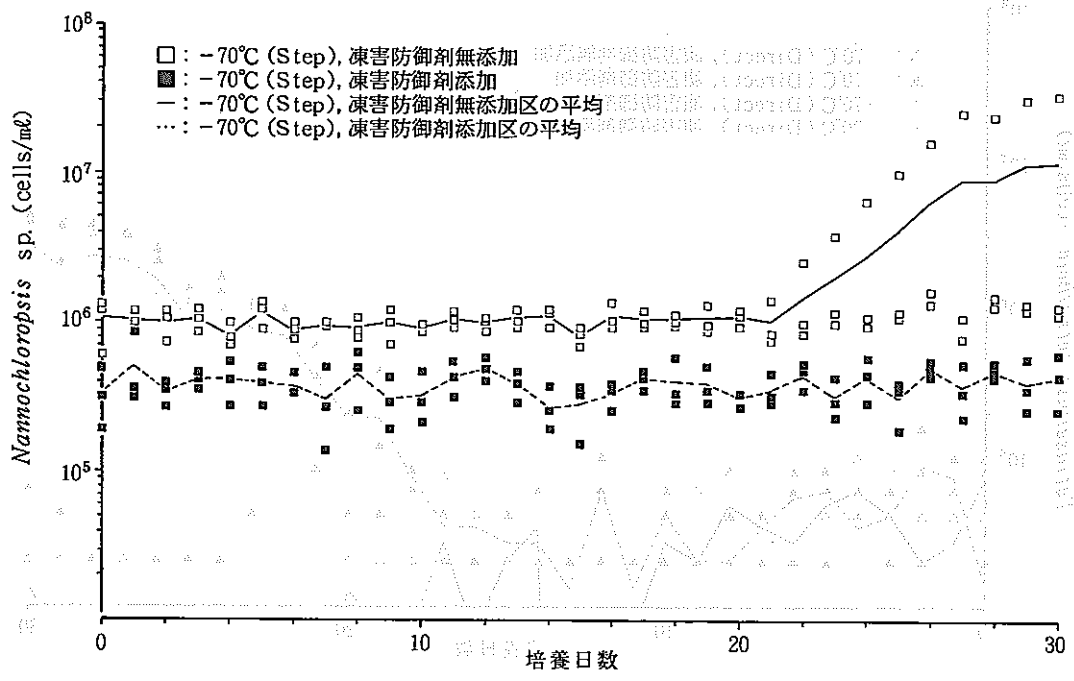


図3 ナンノクロロプシス (-70°C, Step 区) の増殖性

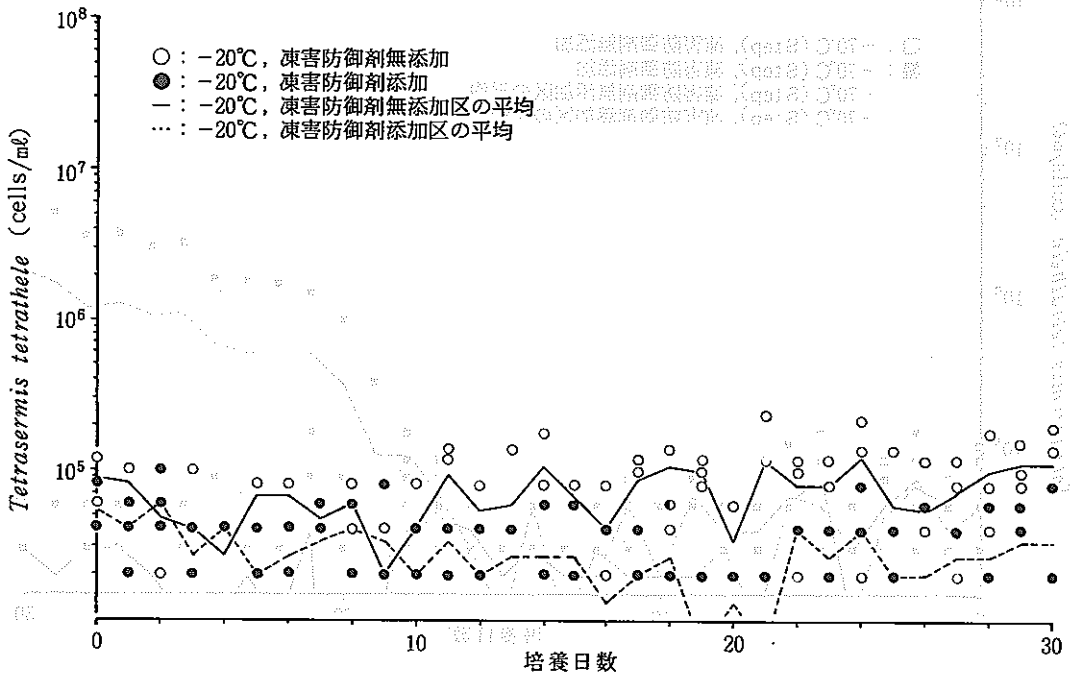


図4 テトラセルミス (-20°C区) の増殖性

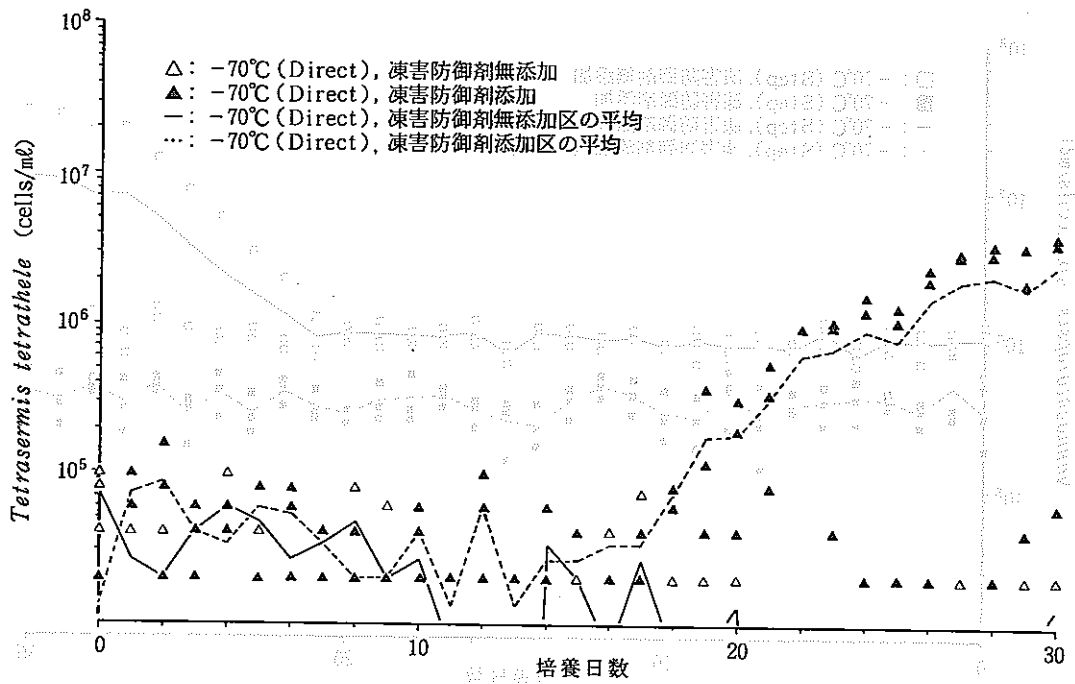


図5 テトラセルミス (-70°C, Direct 区) の増殖性

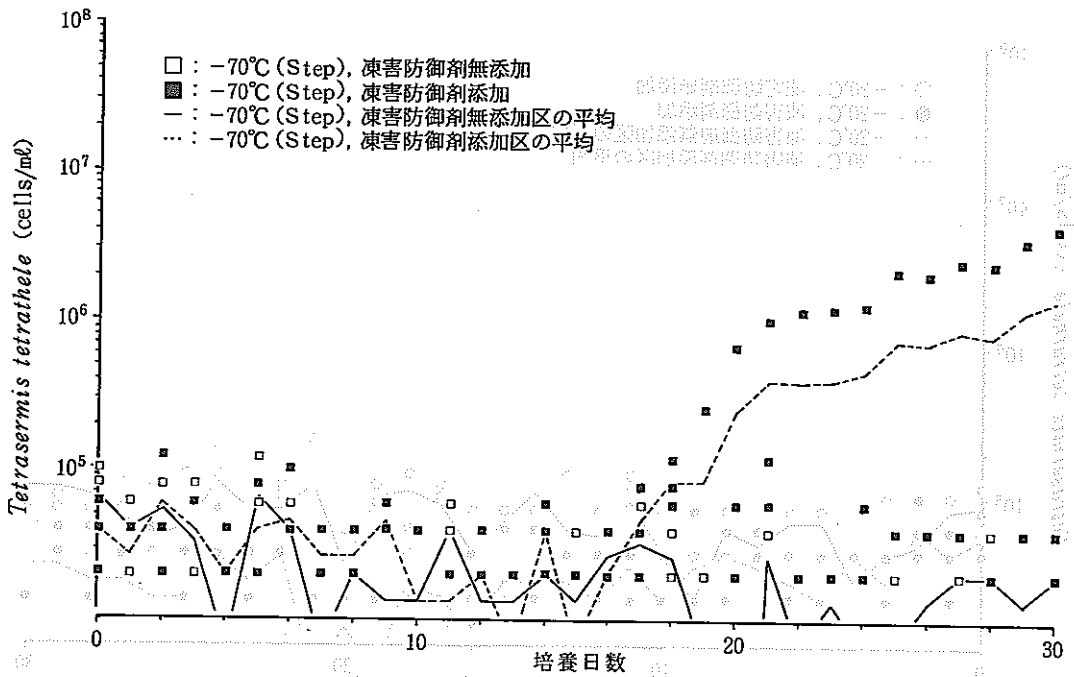


図6 テトラセルミス (-70°C, Step 区) の増殖性

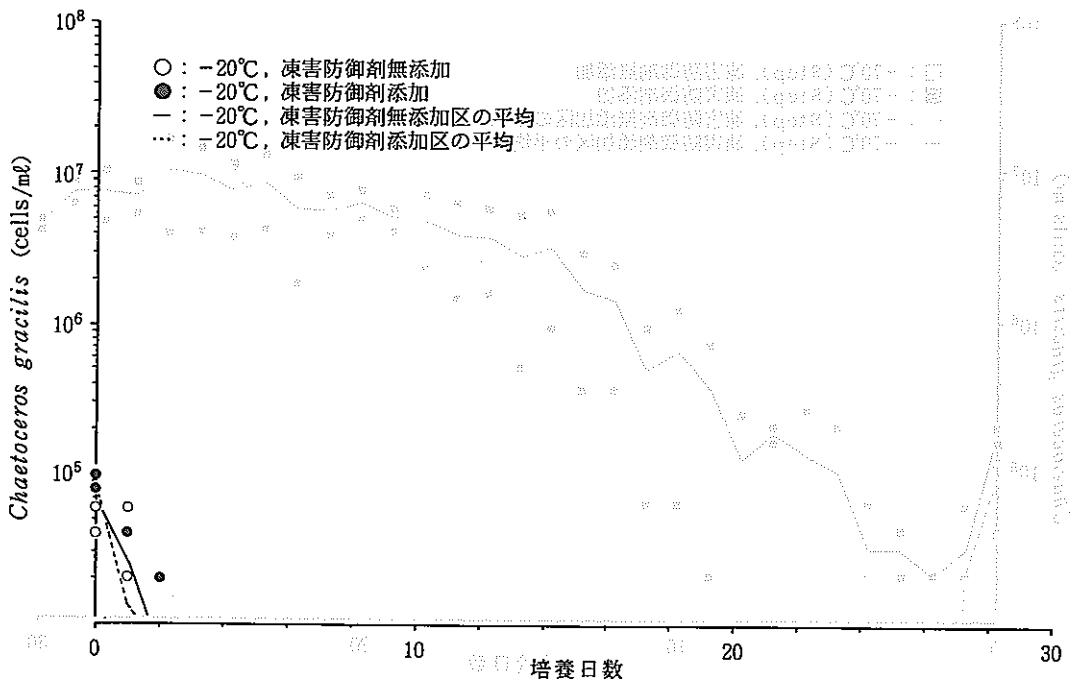


図7 キートセロス (-20°C区) の増殖性

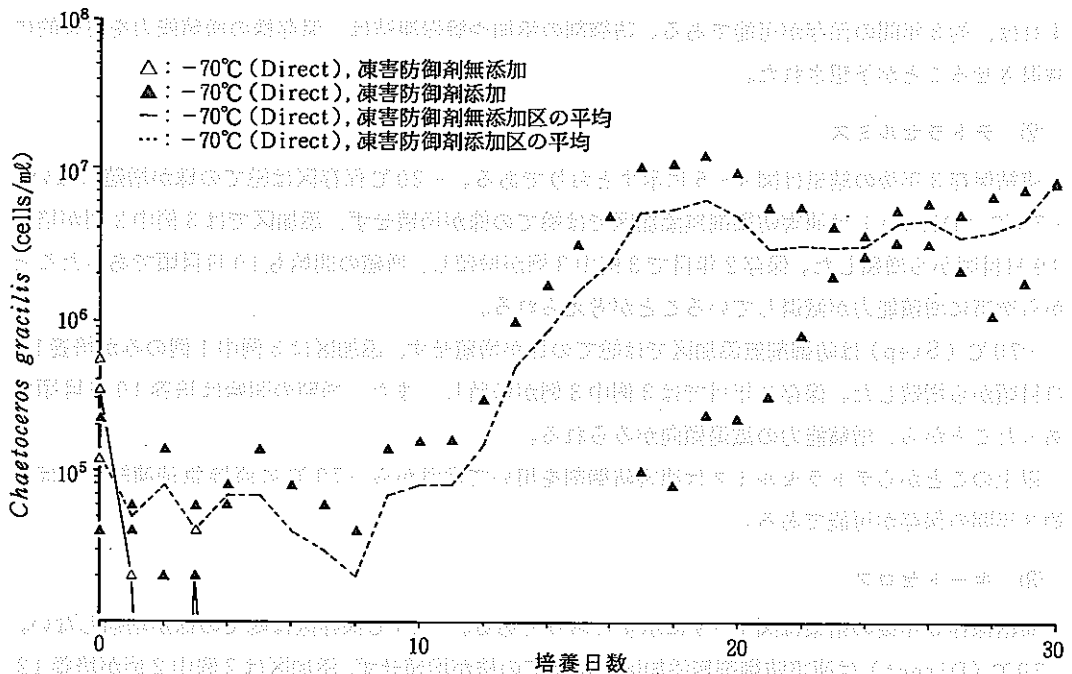


図8 キートセロス (-70°C, Direct 区) の増殖性

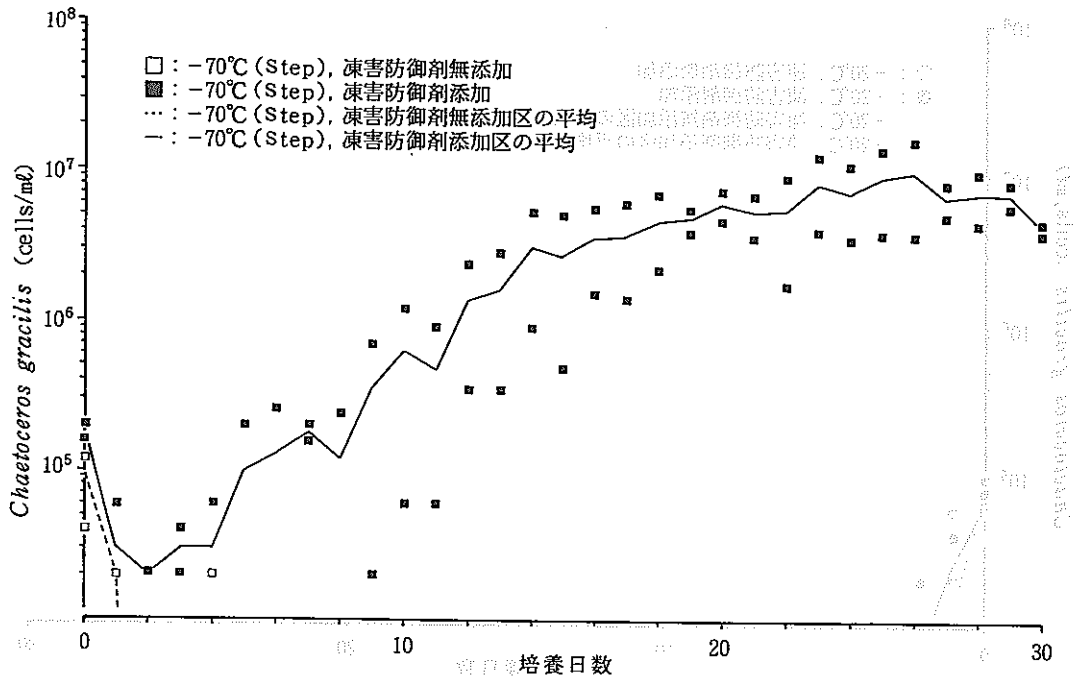


図9 キートセロス(-70°C, Step区)の増殖性

以上のことから、ナンノクロロプシスは凍害防御剤を用いず、常温から-70°Cに直接急速凍結すれば、約3年間の保存が可能である。防御剤の添加や緩慢凍結は、保存株の増殖能力を将来的に減退させることが予想された。

(2) テトラセルミス

凍結保存3年後の結果は図4~6に示すとおりである。-20°C保存区は総ての株が増殖しない。-70°C(Direct)は凍害防御剤無添加区では総ての株が増殖せず、添加区では3例中2例が培養19日目頃から増殖した。保存2年目で3例中3例が増殖し、増殖の開始も10日目頃であったことから次第に増殖能力が減退していることが考えられる。

-70°C(Step)は防御剤無添加区では総ての株が増殖せず、添加区は3例中1例のみが培養19日目頃から増殖した。保存2年目では3例中3例が増殖し、また、増殖の開始は培養10日目頃であったことから、増殖能力の減退傾向がみられる。

以上のことからテトラセルミスは凍害防御剤を用いて常温から-70°Cに直接急速凍結すれば、約3年間の保存が可能である。

(3) キートセロス

凍結保存3年後の結果は図7~9に示すとおりである。-20°C保存区は総ての株が増殖しない。-70°C(Direct)は凍害防御剤無添加区では総ての株が増殖せず、添加区は2例中2例が培養12~19日目頃にかけて増殖を開始した。保存2年目は培養4日目頃から増殖しており、増殖能力の