

生物餌料の培養技術に関する研究

(シャコガイ共生藻の大量培養技術開発研究)

玉城 信 (沖縄県水産試験場八重山支場)

I. 目的・背景

沖縄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との共生関係が成立する時期である。¹⁾ シャコガイ共生藻は初期殻頂期仔貝の主な餌料であると同時にシャコガイ類の生存そのものに直接関与している藻類である。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。^{1,12)} この研究では共生藻の保存、拡大培養条件を確立すると共に細胞形態変化及び別種シャコガイとの共生機構を解明し、シャコガイ種苗生産技術の高度化を図る。

II. 方法

1. 初代培養条件の検討

元種となる共生藻は沖縄県水産試験場八重山支場で生産したヒレジャコ3年貝～7年貝の外套膜より取り出した。¹⁾ 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、溶解しない泡状の固形物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。培養は平底フラスコ(500ml及び1,000ml)を用い恒温培養室で通気試験を行なった。恒温培養室の照明は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。蒸発した水分は毎日滅菌蒸留水で補った。共生藻の増殖状態は細胞数を計測した。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、²⁾ 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を投入して振り回し、壁面に付着した共生藻を剥ぎ落とした。³⁾ 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、ジェネレーションホモジナイザー(25,000回転/分)で1分間攪拌し、試料を血球計算盤(改良ノイバウエル2面タイプ)で各試験区毎に6回計数後、その平均を細胞密度とした。^{4,5,6)} 培地の栄養塩組成は表1に、初代培養試験1、2の条件等は表2、表3に示した。

2. 継代培養条件の検討

初代培養後通気停止し、光強度2～3 μ mol/m²/sで振盪培養した保存元種及び初代培養終了直後の元種を植え継いで継代培養試験を行った。培養海水、照明時間、蒸発した水分の補完方法、細胞密度の計数方法等は初代培養と同様に行った。

継代培養中に夾雑物（珪藻類、緑藻類）の増殖による共生藻の増殖不良を防止する目的でシャコガイの外套膜から元種を採取する際の雑藻混入試験を行った。⁷⁾ 継代培養試験1～3の方法等は表4～表6に示し、雑藻混入試験の条件等は表7に示した。

表1 培地の栄養塩組成

培地名	栄 養 塩	組 成
P-E S 改変培地	海水 ¹⁾ 1,000 ml	※ これは従来から沖縄県水産試験場八重山支場でシャコガイ種苗生産時に使用している培地である。
	No.1液 ノリマックス液 ²⁾ 1 ml	
	No.2液 L-シスチン液 ³⁾ 1 ml	
E S M 培地	No.3液 ビタミン混合液 ⁴⁾ 1 ml	※ 2). 3). 5) は調合後冷暗所保存、4) は調合後凍結保存
	No.4液 ストレプトマイシン液 ⁵⁾ 1 ml	
	0.01 μm中空糸膜で濾過した超精密濾過海水 990 ml	
E S M 培地	土壤浸出液 ⁶⁾ 10 ml	※ 2). 3). 5) は調合後冷暗所保存、4) は調合後凍結保存
	NaNO ₃ 120 mg	
	K ₂ HPO ₄ 5 mg	
	ビタミンB ₁₂ 1 μg	
	ビオチン 1 μg	
	塩酸チアミン 100 μg	
	Fe・EDTA 259 μg	
	Mn・EDTA 332 μg	
	Tris 1 g	
	1) 土壤浸出液	
土壤 1 kg	1,000 ml	
蒸留水 1,000 ml		
これを60分間煮沸し、のち2日間暗所に放置、濾別する。濾液600mlに蒸留水400mlを加えて使用		

表2 初代培養試験1の培養方法及び条件

水温及び光強度	20℃・40 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ 区 20℃・80 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ 区 20℃・150 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ 区 25℃・40 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ 区 25℃・80 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ 区 25℃・150 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ 区 30℃・40 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ 区 30℃・80 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ 区 30℃・150 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ 区 35℃・80 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ 区
照明時間	8:00 ~ 20:00 (12時間)
計数試料抜き取り方法	500 ml 全量抜き取り
試験開始細胞密度	20×10^4 cells/ml
培地	P-E S 改変培地
塩分濃度	34 ‰

表3 初代培養試験2の培養方法及び条件

水温	27.8 ~ 33.2℃
光強度	60 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ 区 80 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ 区 110 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ 区
照明時間	8:00 ~ 20:00 (12時間)
計数試料抜き取り方法	100 ml 部分抜き取り
試験開始細胞密度	40×10^4 cells/ml
培地	P-E S 改変培地
塩分濃度	34 ‰

表4 継代培養試験1の培養方法及び条件

元種履歴及び培養方法	初代培養（培養11日目）後に通気を停止し、振盪培養開始。 振盪培養（培養12日目）後、通気再開
培養容器	500ml三角フラスコ（水量300ml）
継代方法	計数日毎に抜き取った1/3量（100ml）分の培地を添加
水温	28.6 ~ 31.2 °C
光強度	振盪培養期間：2 ~ 3 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ 通気培養期間：60 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$
試験開始細胞密度	$339 \times 10^4 \text{ cells}/\text{ml}$
培地	P-E S 改変培地
塩分濃度	34 ‰

表5 継代培養試験2の培養方法及び条件

元種履歴	初代培養（培養11日目）後、振盪培養（培養23日目）し、 計数後、密度調節
水温	29.3 ~ 29.9 °C
光強度	60 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$
試験開始細胞密度	$40 \times 10^4 \text{ cells}/\text{ml}$
培地	P-E S 改変培地区 E S M 培地区
塩分濃度	34 ‰

表6 継代培養試験3の培養方法及び条件

水温	28.4 ~ 30.4 °C
光強度	60 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$
元種履歴	A : 継代2代目（初代培養12日間）・ $40 \times 10^4 \text{ cells}/\text{ml}$ 区 B : 継代2代目（振盪培養21日間、初代培養5日間） ・ $40 \times 10^4 \text{ cells}/\text{ml}$ 区 C : 継代3代目（初代培養14日間、振盪培養21日間、継代 培養2代13日間及び7日間）・ $40 \times 10^4 \text{ cells}/\text{ml}$ 区
培地	P-E S 改変培地