

# I 餌料藻類の培養と性状調査

## 1. 餌料藻類の凍結保存試験

### 材料と方法

水産試験場八重山支場で維持、培養している通称海産クロレラ（以下クロレラ）とテトラセルミス、および沖縄県栽培漁業センター由来キートセロス *Chaetoceros gracilis* について調べた。方法はいずれもミッケル海水（Allen & Nelson, 1910）を用いて25℃、6000ルクスの人工気象器内で静置培養し（以下培養条件はおなじ）、十分な発育がみられる培養液を3000 r.p.m. で遠心分離して上澄み液を捨て、滅菌海水で数回洗浄する。その後ミッケル海水寒天平板上に画線培養して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に培養して凍結保存試験の原株とした。なお、キートセロスについては細菌の除去が充分に行えなかった。原株はミッケル海水で4日間培養し、十分な増殖がみられた培養液をセラムチューブに無菌的に分注し、-20℃と-70℃での保存条件を比較した。-70℃では室温から直接凍結した区（Direct）と4℃、-20℃、および-70℃と一昼夜づつ下降した区（Step）を設定し、-20℃はStep区のみ、また各々の区について凍害防御剤（グリセリン10%とジメチルスルホキシド5%の混合液）の有無による影響を比較検討する。保存期間は凍結後1週間、1カ月、3カ月、6カ月、1年、2年、および3年間で、保存株の増殖能力を調査する。なお、いずれの試験も3系列の同じ実験区を設定して行った。保存期間終了後の増殖能力調査は凍結保存株を40℃の温水中で急速融解し、その後滅菌海水で数回洗浄して培地成分を除去し、定法に従って培養した。

### 結果と考察

凍結試験供試原株のミッケル海水における増殖能力は図1に示す通りである。クロレラは培養後1週間は急激な増殖がみられ、17日目までに $10^7$ 細胞数/mlになった。テトラセルミスは培養3日目までは急激な増殖が見られるが、その後微増して $10^6$ 細胞数/mlになった。キートセロスも培養後3日目までは急激な増殖が見られるが、その後約 $10^6$ 細胞数/mlで増減しながら推移した。

なお、凍害防御剤含有培地と不含培地で試験株の細胞数濃度に相違がみられたために、各株の濃度別増殖力の比較試験を行った。図2にクロレラの濃度別増殖力比較試験の結果を示す。試験培養液を開始時 $1.53 \times 10^6$ 、 $3.40 \times 10^5$ 、および $4.00 \times 10^4$ 細胞数/mlに調整し、その後の変化を調べた。時間経過

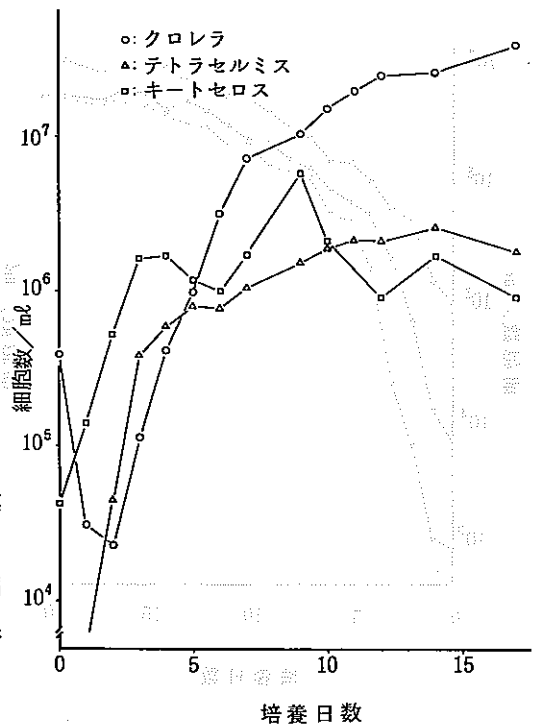


図1 凍結試験供試原株の増殖曲線

とともに差は減少する傾向がみられる。図3にテトラセルミスの濃度別増殖力比較試験の結果を示す。1.02 × 10<sup>5</sup>、6.67 × 10<sup>3</sup>、および 8.00 × 10<sup>2</sup> 細胞数/ml 区を設定したが、いずれもクロレラの傾向とほぼ類似していた。図4にキートセロスの試験結果をしめす。8.02 × 10<sup>5</sup>、2.07 × 10<sup>5</sup>、および 4.00 × 10<sup>4</sup> 区を設定したが、いずれも培養後5日目までは急激な増殖が見られ、その後微増する。なお、10<sup>4</sup> 区は10日目以降に減少する。

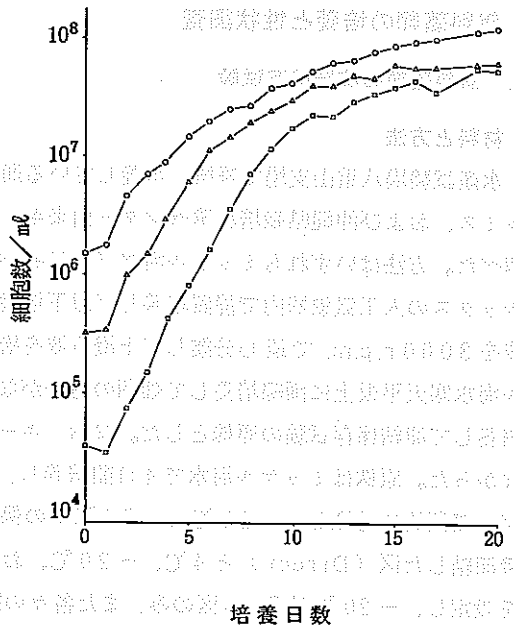


図2 通称クロレラの濃度別増殖力比較試験

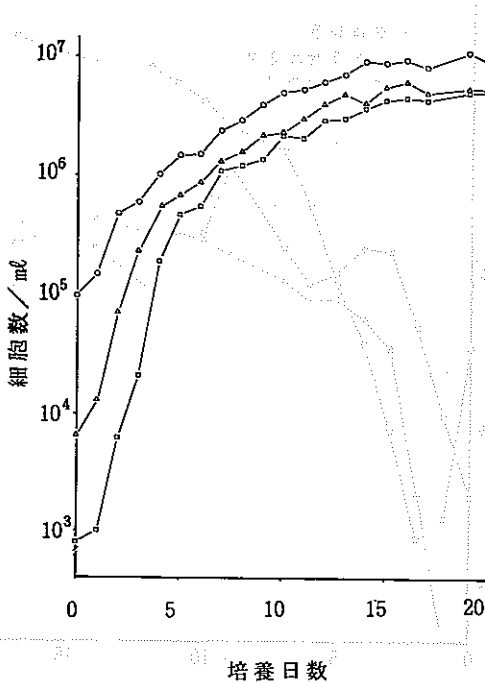


図3 テトラセルミスの濃度別増殖力比較試験

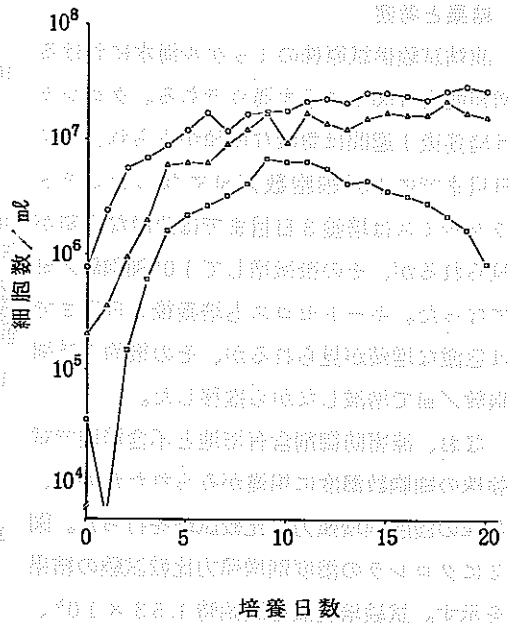


図4 キートセロスの濃度別増殖力比較試験

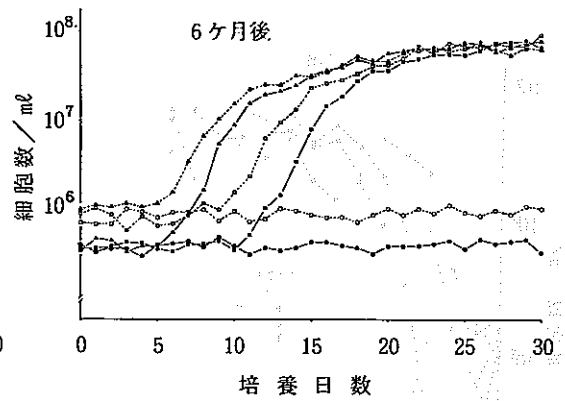
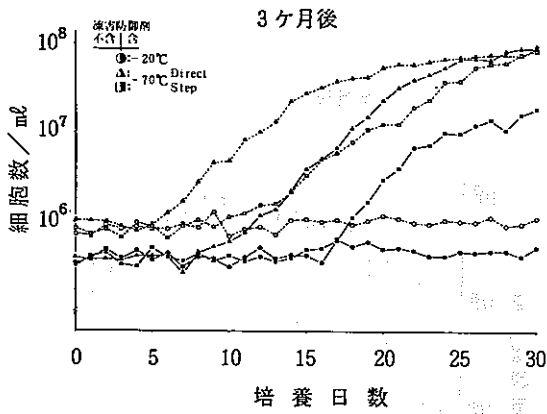
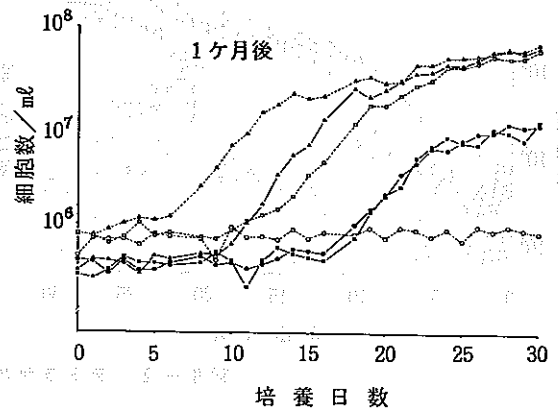
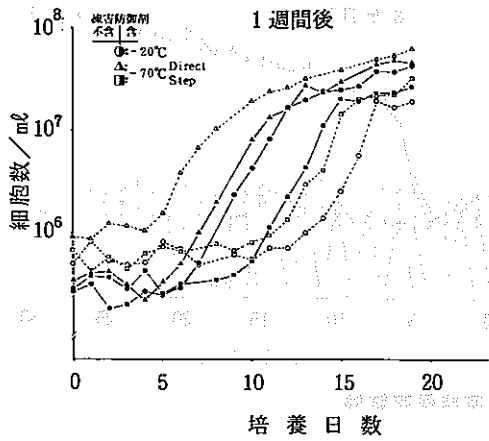


図5 クロレラ凍結保存試験

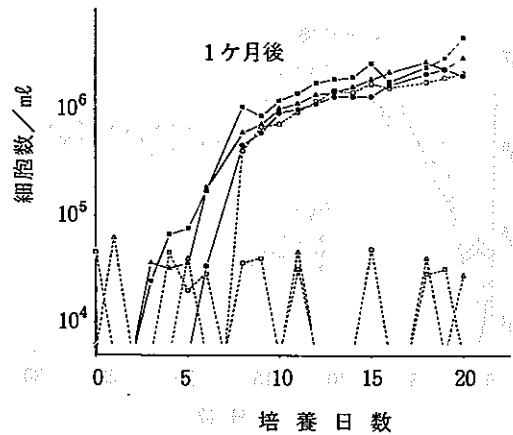
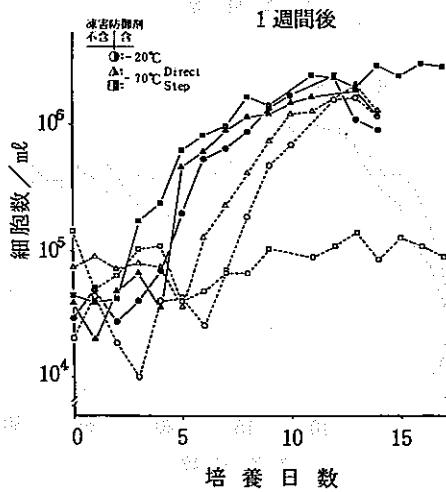


図6-1 テトラセルミス凍結保存試験

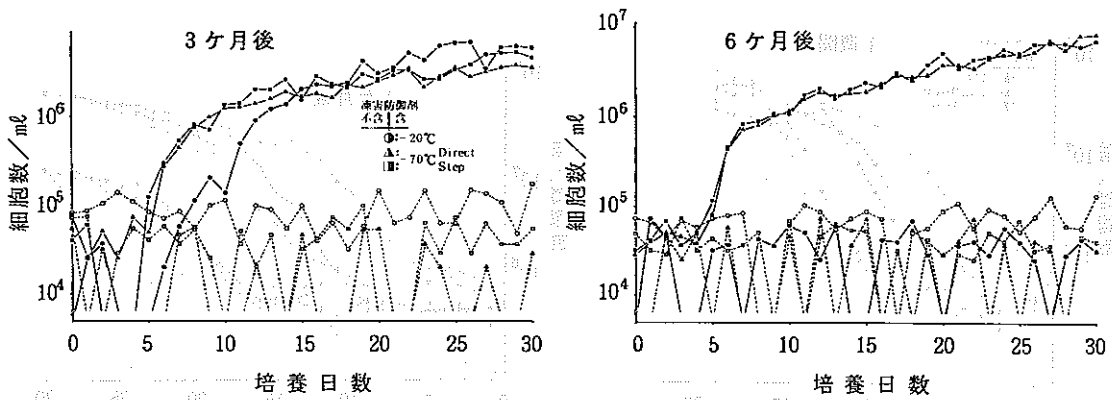


図6-2 テトラセルミス凍結保存試験

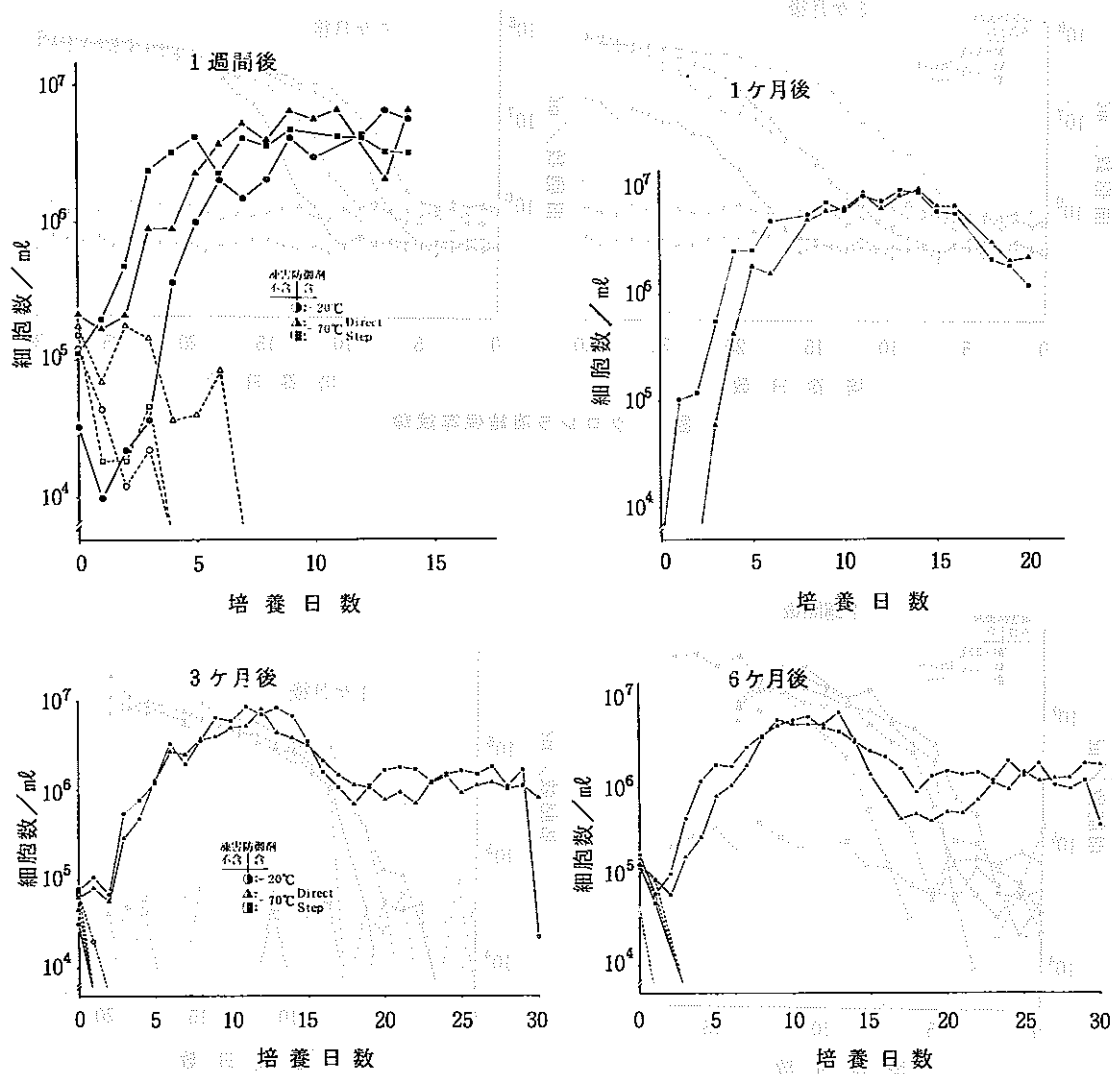


図7 キートセロス凍結保存試験

クロレラの凍結後6カ月目までの保存結果は図5に示す通りである。凍結1週間の影響は原株の増殖曲線に比べて多少増殖の開始が遅れる傾向がみられるが、いずれの試験区も十分な増殖が認められた。なお、結果は3系列の幾何平均を求めた。凍結1カ月の影響はほぼ1週間の結果に類似しているが、凍害防御剤不含培地で $-20^{\circ}\text{C}$ に凍結した区では30日間増殖がみられなかった。また、防御剤含有培地で $-20^{\circ}\text{C}$ 凍結区と $-70^{\circ}\text{C}$  Step区では3系列のうち1系列に増殖がみられなかった。凍結3カ月の影響もほぼ類似した傾向がみられたが、 $-20^{\circ}\text{C}$ 凍結区では凍害防御剤の有無に関わらず30日間増殖がみられなかった。凍結6カ月の影響は $-20^{\circ}\text{C}$ 保存区を除けば1週間後の結果とほぼ類似しており、 $-70^{\circ}\text{C}$  Direct区では5日目から、またStep区では10日目前後から増殖がみられ、培養してから約20日目にはほぼ一定した濃度にまで増殖した。

テトラセルミスの凍結保存試験結果は図6-1と2に示す通りである。凍結1週間の影響では凍害防御剤不含培地で $-70^{\circ}\text{C}$  Step区では17日間増殖がみられず、その後30日目まで観察したが増殖は認められなかった。また、防御剤不含培地で $-20^{\circ}\text{C}$ 区と $-70^{\circ}\text{C}$  Direct区は多少増殖開始が遅れる傾向がみられ、防御剤含有培地における各区はすみやかな増殖が認められる。凍結1カ月では防御剤不含培地の $-70^{\circ}\text{C}$ 区で20日間増殖がみられず、その後30日目までの観察でも増殖しなかった。他の区では多少増殖開始が遅れる傾向が認められるが、ほぼ正常な増殖がみられた。凍結3カ月では防御剤不含培地を用いた区はいずれも30日間増殖がみられず、防御剤含有培地における各区はほぼ正常な増殖がみられる。凍結6カ月の影響は防御剤含有培地で $-70^{\circ}\text{C}$ 凍結区のみが増殖し、その他の区では増殖がみられなかった。

キートセロスの凍結保存試験結果は図7に示す通りである。凍結1週間の影響は防御剤含有培地における各区はほぼ正常な増殖がみられるが、防御剤不含培地における各区はいずれも増殖がみられず、時間の経過とともに細胞も観察できなくなった。凍結1カ月では防御剤含有培地の $-70^{\circ}\text{C}$ 区のみで増殖がみられ、他の区での増殖はみられない。凍結3と6カ月の結果は1カ月とはほぼ同様の傾向を示す。

クロレラ、テトラセルミス、およびキートセロスとも凍結保存試験開始時において、凍害防御剤含有培地の細胞濃度が不含培地に比べて低い傾向がみられるが、各株の濃度別増殖力比較試験結果から、ほとんど影響ないものと考えられる。

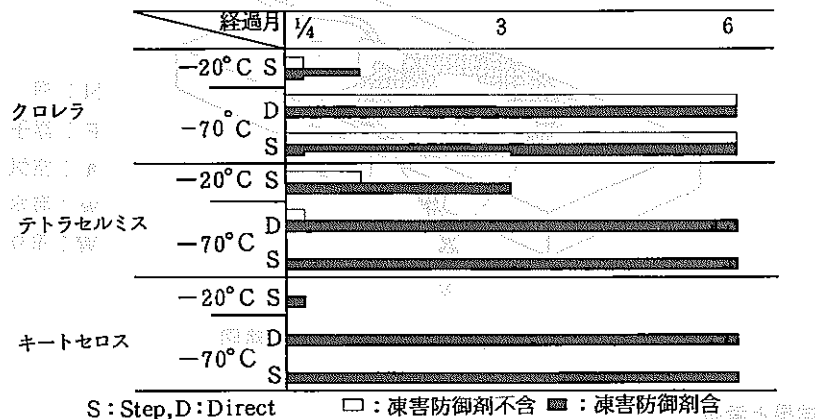


図8 凍結試験の要約