

単細胞緑藻 *Scenedesmus quadricauda* の大規模培養と 淡水産ワムシに対する餌料としての有効性について

柳 田 洋 一

はじめに

現在、当内水面水産試験場においては、ワカサギ、フナ等の種苗生産を行う際に初期の餌料生物の培養方法として、養魚池に有機肥料を施肥し、ワムシ類、鰓脚類、橈脚类等動物プランクトンの自然増殖を期待する、いわゆる粗放的な手法が用いられている。

しかし、粗放的培養方法では餌料生物の繁殖量は池ごとに異なり稚魚の生産量が安定していないのが現状であり、安定した種苗生産を行うためには特に養魚初期餌料生物として淡水産ワムシ類を計画的に必要とする量を培養する技術の開発が必要であると思われる。

本研究は、淡水産ワムシ類を計画的に培養することを目的に、単細胞緑藻類 *S. quadricauda* が淡水産ワムシ類を培養する際の餌料としての有効性及び *S. quadricauda* の大規模培養* の可能性について検討した。

なお、Miyazaki *et al* (1985) の報告によれば、*S. quadricauda* はアンモニア耐性を有し、豚糞メタン発酵消化脱離液中で成育し、生育水温は広く5～38℃である。このMiyazaki *et al* の得た知見は *S. quadricauda* が養魚池における粗放的な培養方法に適する性質を持つものであると考えられるので、本研究においては、その有効性について検討することとした。

また、淡水産ワムシ類については、堀ら(1977)によって孵化初期のワカサギ仔魚の摂餌可能な餌料の大きさは約100 μ 以下であることが報告されているので、被甲長100 μ 前後のツボワムシ属2種 (*Brachionus calyciforus*, *B. urceolaris*) を選定した。

*ここでいう大規模培養とは、室内のビーカー等の小型容器での培養を小規模培養というのに対して、屋外等でのポリカーボネイト水槽やコンクリート水槽などの大型容器での培養を指すものである。

材料と方法

1. 単細胞緑藻 *S. quadricauda* の大規模培養

S. quadricauda は原 慶明助教授が筑波大学において分離し、保存しているものの一部を譲り受けた。

(1) 施肥培養液の検討

本実験では、*S. quadricauda* を効率良く大規模培養を行うことを目的に、処方が簡単で

しかも *S. quadricauda* の増殖に適した施肥培養液を知るために、500ℓ円形透明ポリカーボネイト水槽を屋外に設置し、種株を 1×10^4 cells/ml になるように接種した約500ℓの培養液を収容し、batch式通気法で行った。

実験区に際しては、硫安と過磷酸石灰の添加量を変えた2区（A区 硫安：過磷酸石灰 = 10g:2g/100ℓ，B区 硫安：過磷酸石灰 = 100g:20g/100ℓ）と窒素，磷酸，カリを含む混合化成肥料を100ℓ当り10g添加した1区（C区）を設けた。なお，硫安は，21.0%のアンモニア性窒素が含まれ，過磷酸石灰は，17.5%の磷酸性磷を含有している。一方，混合化成肥料は，アンモニア性窒素10.0%，硝酸性窒素8.0%，磷酸性磷4.0%，硫酸カリ12.0%を含有している。

細胞濃度の測定については，Thomaの血球計算板を用いて計数し，その平均値を求めた。さらに，この平均値を基に佐々（1965）と同様に $k_g = 1 / (t_1 - t_0) \log(N_1 / N_0)$ によって，増殖速度を算出した。ここで N_0 は実験開始時 (t_0) における細胞濃度， N_1 は t_1 日目における細胞濃度を示す。

(2) 大規模培養の検討

本実験では，*S. quadricauda* を屋外等の水槽で周年において大規模に培養することを目的に季節による増殖傾向の差異を知るために，屋外に設置した500ℓ円形透明ポリカーボネイト水槽を用いて，水温の異なる時期（高水温期9月6日～9月28日，低水温期10月23日～11月15日）に1回ずつ計2回行った。

次に，培養器の大きさや材質による増殖傾向の違いを調べるために，テラピニア飼育用ガラスハウスの1.4 m³コンクリート水槽（L 1.95 m × W 1.45 m × D 0.5 m）での培養を行い，透明ポリカーボネイト水槽での培養と比較した。

培養液には，地下水100ℓに対して硫安10g，過磷酸石灰2gを添加したものをを用いた。コンクリート水槽で通気を2本で行った他は，培養条件，培養方法及び細胞濃度の測定方法等は前実験と同様である。

2. 淡水産ワムシ類に対する餌料としての有効性

微小藻類を餌料として用いたbatch式培養法で，淡水産ワムシ類を効率良く培養するには，餌料藻類の餌料としての有効性を知るとともに適正給餌濃度を求め，それを満たす餌料藻類を予め培養しておく必要がある。

本実験では，*S. quadricauda* を餌料として用いた淡水産ワムシ類のbatch式培養法での餌料としての有効性，さらに適正給餌濃度についての検討を行った。

供試した淡水産ワムシ類は，ツボワムシ属の2種（*B. calyciforus*，*B. urceolaris*）である。*B. calyciforus* は茨城県行方郡玉造町の溜池から採集したものである。*B. urceolaris*

は国立環境研究所微生物系統保存施設から分譲を受けた霞ヶ浦産のものである。

まず、*B. urceolaris* を用いて、*S. quadricauda* の給餌濃度を4段階 (0, 250, 500, $1,000 \times 10^4$ cells/ml) に分けて行った。

次に、*B. calyciflorus* を用いて、*S. quadricauda* の給餌濃度を更に高めた試験区 (500, 5,000, $10,000 \times 10^4$ cells/ml) を設け、過剰給餌の影響を調べるために実験を行った。

これらの実験区について、300 ml 平底フラスコに飼育水約 300 ml を収容し、これに 5 個体/ml 密度のワムシを接種して水温約 20℃、照度を約 4 klux に維持しながら、batch 式通気法で培養を行った。飼料の沈降を防ぐため弱く通気したうえ、1 日数回飼育水を攪拌した。飼育水は培養期間中交換せず、フラスコの底に沈んだ排泄物等は除去しなかった。

給餌に際しては、*S. quadricauda* を遠心分離 (回転数 3,000 rpm・15 分) によって細胞濃縮液を作り、各試験区に所定の濃度になるように添加した。

ワムシの密度については、飼育水 1 ml に含まれるワムシをプランクトン計数板で計数し、その平均値を求めた。さらに、この平均値を基に岡内 (1988) と同様に $G = 1 / (t_1 - t_0) \ln (N_1 / N_0)$ によって、ワムシの増殖率を算出した。ここで N_0 は実験開始時 (t_0) におけるワムシ密度、 N_1 は t_1 日目におけるワムシ密度を示す。

結 果

1. 単細胞緑藻 *S. quadricauda* の大規模培養

(1) 施肥培養液の検討

S. quadricauda の各試験区における細胞数の増殖状況を図 1 に示した。

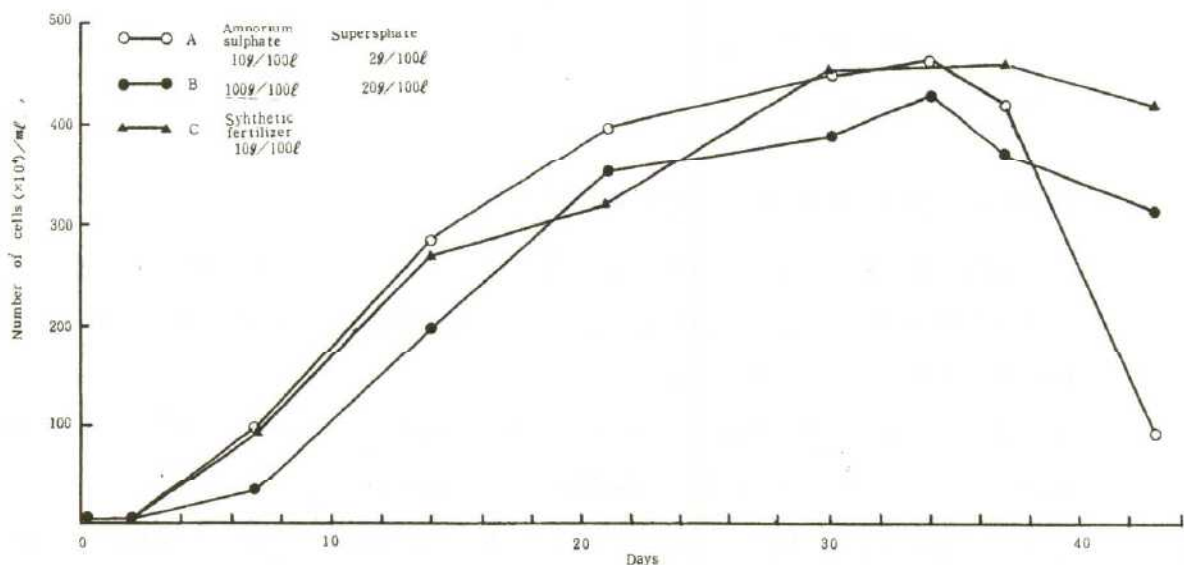


図 1 濃度の異なる施肥培養液での *S. quadricauda* の増殖経過

実験期間中に水温は 5.6 ~ 15.8℃ の範囲で推移し、平均で 12.1℃ であった。

S. quadricauda の増殖状況を見ると、B区で培養初期に増殖の停滞が見られたほかは、各区とも増殖は良好であった。特に施肥料がB区の1/10倍であるにもかかわらずA区増殖量は培養開始後21日までは、他の2区を上回った。また、化成肥料を添加したC区増殖も良好で、培養開始後30日目以降は、他の2区を上回った。

各区の測定時における細胞の最大増殖量は、A、B、C各区で、それぞれ 465×10^4 cells/ml (接種後34日目)、 430×10^4 cells/ml (接種後34日目)、 460×10^4 cells/ml (接種後38日目) であった。また、各区とも最大増殖量に達した後は、細胞濃度の減少が認められた。特にA区での減少が著しかった。

接種後から最大増殖濃度に到るまでの増殖速度を先に示した式によって求めると、A区 1.02、B区 1.01、C区 1.01 で、大差がなかった。

(2) 大規模培養の検討

① 500ℓ ポリカーボネイト水槽での増殖

S. quadricauda の 500ℓ 屋外水槽での細胞数の増殖状況を図2に示した。

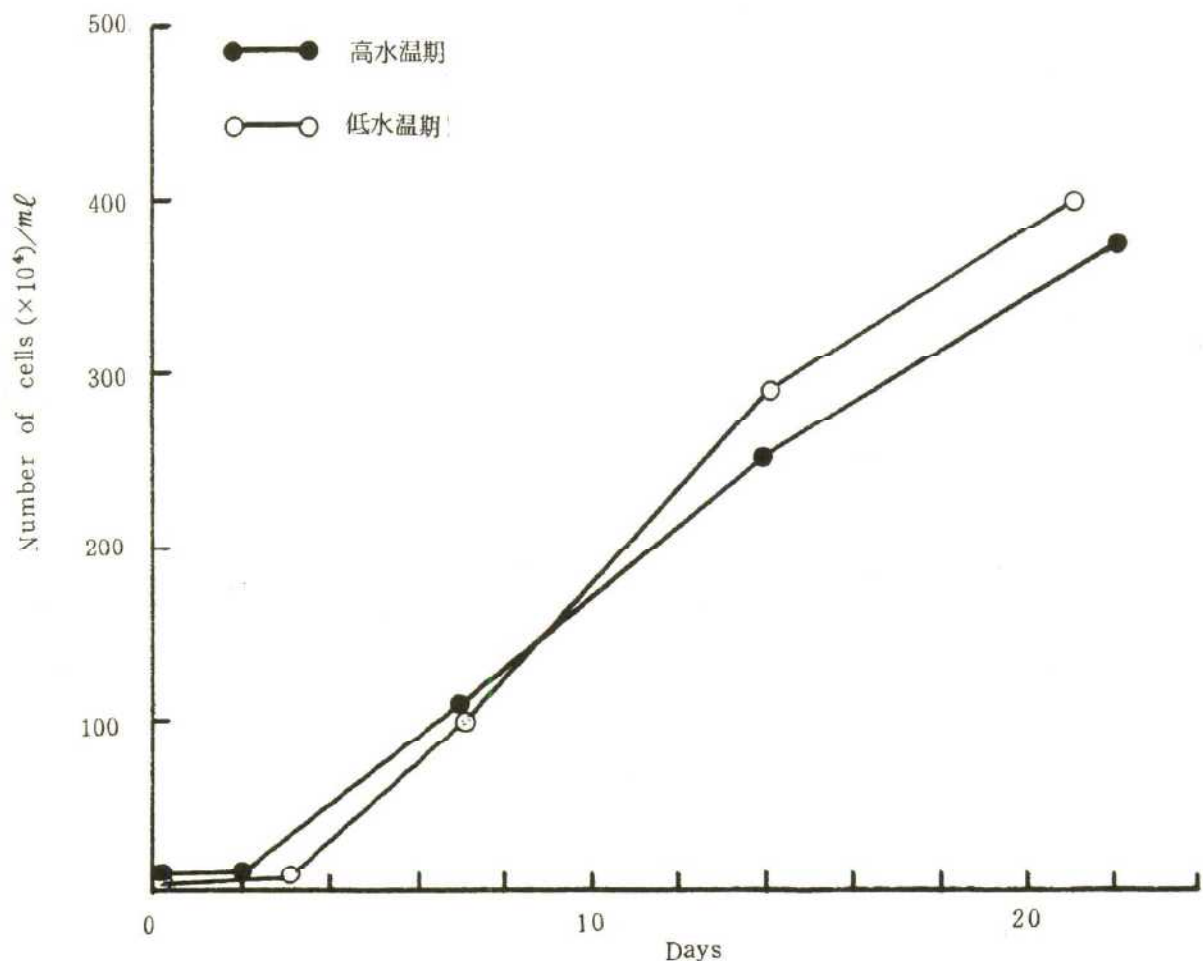


図2 水温の異なる時期における *S. quadricauda* の増殖経過

高水温期の実験では、実験期間中に水温は23.0～33.5℃の範囲で推移し、平均で28.2℃であった。実験終了時（接種後22日目）における細胞の濃度は、 $373 \times 10^4 \text{ cells/ml}$ に達し、増殖速度は1.02であった。

低水温期の実験では、実験期間中に水温は5.6～15.8℃の範囲で推移し、平均で12.1℃であった。実験終了時（接種後21日目）における細胞の濃度は、 $395 \times 10^4 \text{ cells/ml}$ に達し、増殖倍率は1.05であった。

② 1.4 m³ コンクリート水槽での増殖

S. quadricauda の1.4 m³ コンクリート水槽での細胞数の増殖状況を図3に示した。

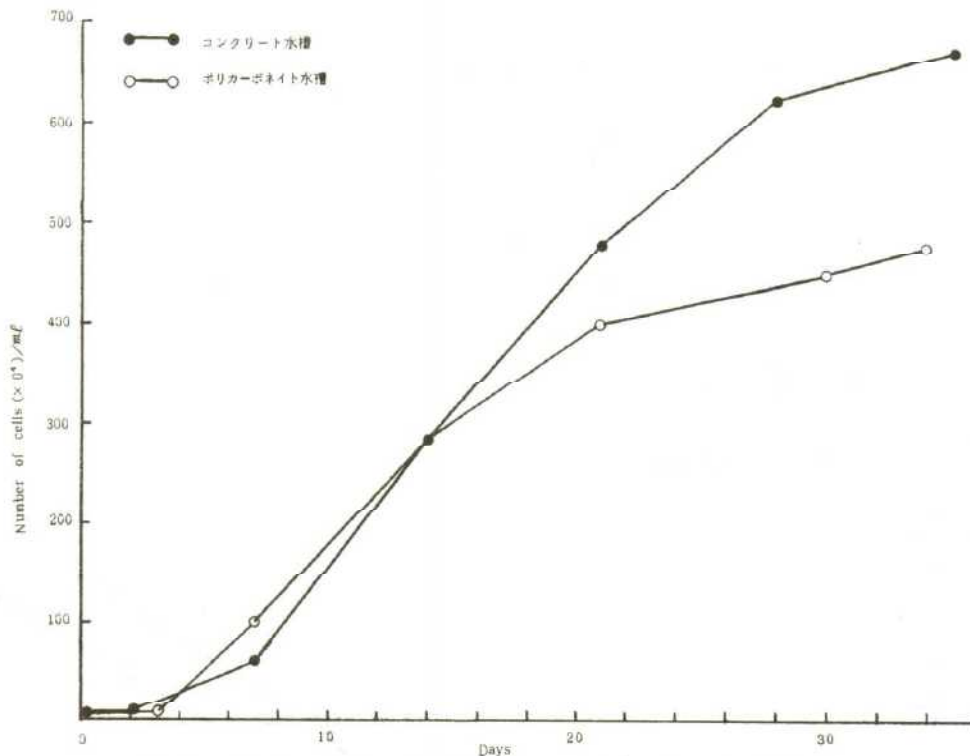


図3 異なる容器における *S. quadricauda* の増殖経過

実験期間中に水温は13.6～16.6℃の範囲で推移し、平均で14.7℃であった。細胞の濃度は、接種後21日目には $481 \times 10^4 \text{ cells/ml}$ で、増殖速度は1.05であった。実験終了時（接種後35日目）における細胞の濃度は、 $673 \times 10^4 \text{ cells/ml}$ に達し、増殖速度は1.03であった。

今回の実験では、コンクリート水槽での増殖量がポリカーボネイト水槽のものより上回った。

2. 淡水産フムン類に対する餌料としての有効性

各試験区における *B. urceolaris* の増殖状況を図4に示した。

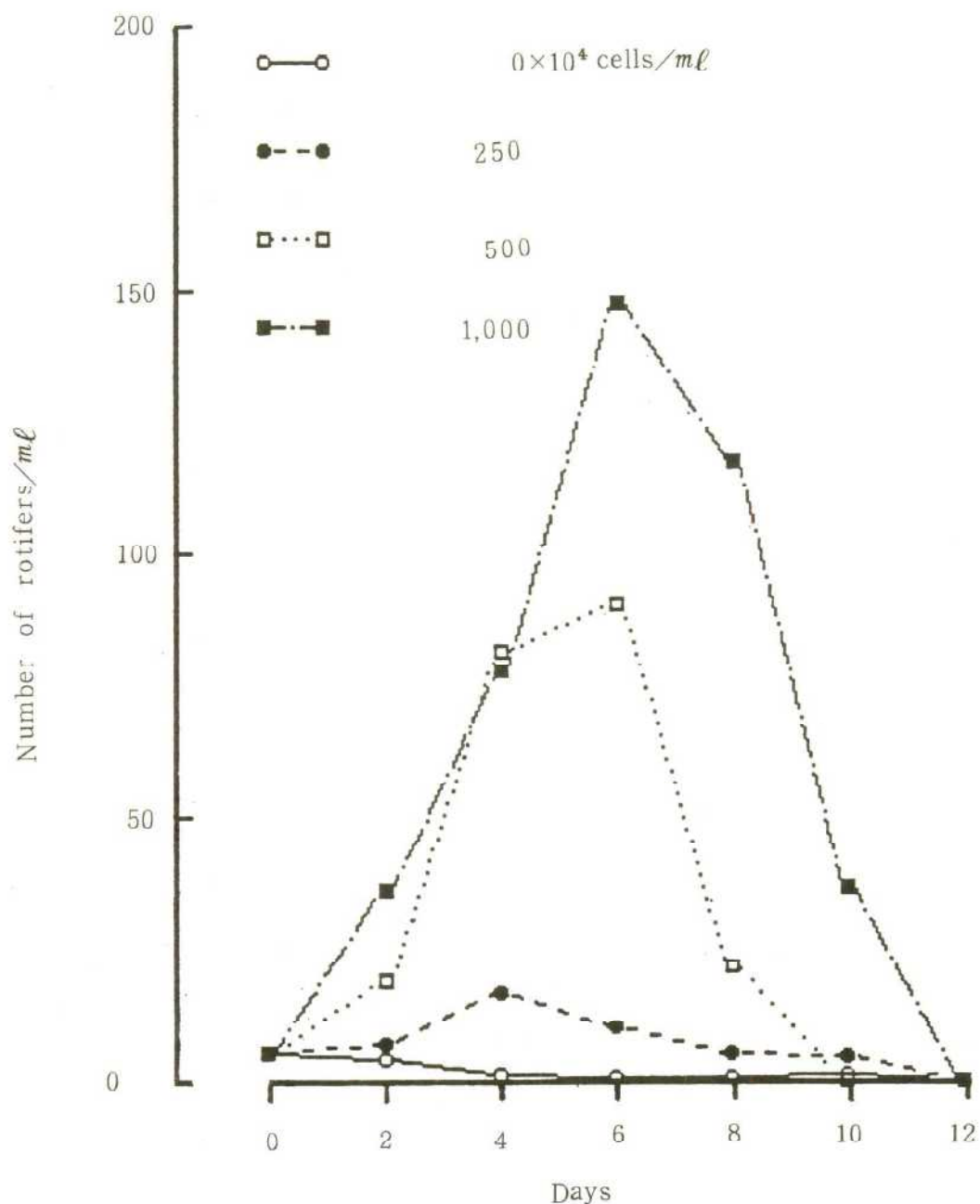


図4 *S. quadricuada* を給餌した *B. urceolaris* の増殖経過

S. quadricuada の給餌濃度が 250×10^4 cells/ml では、4日目まで *B. urceolaris* の増殖がみられ、最大増殖密度 17 個体/ml に達した。最大増殖密度に到るまでの増殖率は 1.05 であった。 500×10^4 cells/ml 区では、6日目まで増殖して最大増殖密度 91 個体/ml に達し、この期間の増殖率は 1.19 であった。 $1,000 \times 10^4$ cells/ml 区では、6日目まで増殖して最大増殖密度 148 個体/ml に達し、この期間の増殖率は 1.23 であった。なお、無給餌区

では増殖は認められず、ワムシ密度は徐々に減少していった。

次に、*B. calyciforus* の各試験区における増殖状況を図5に示した。

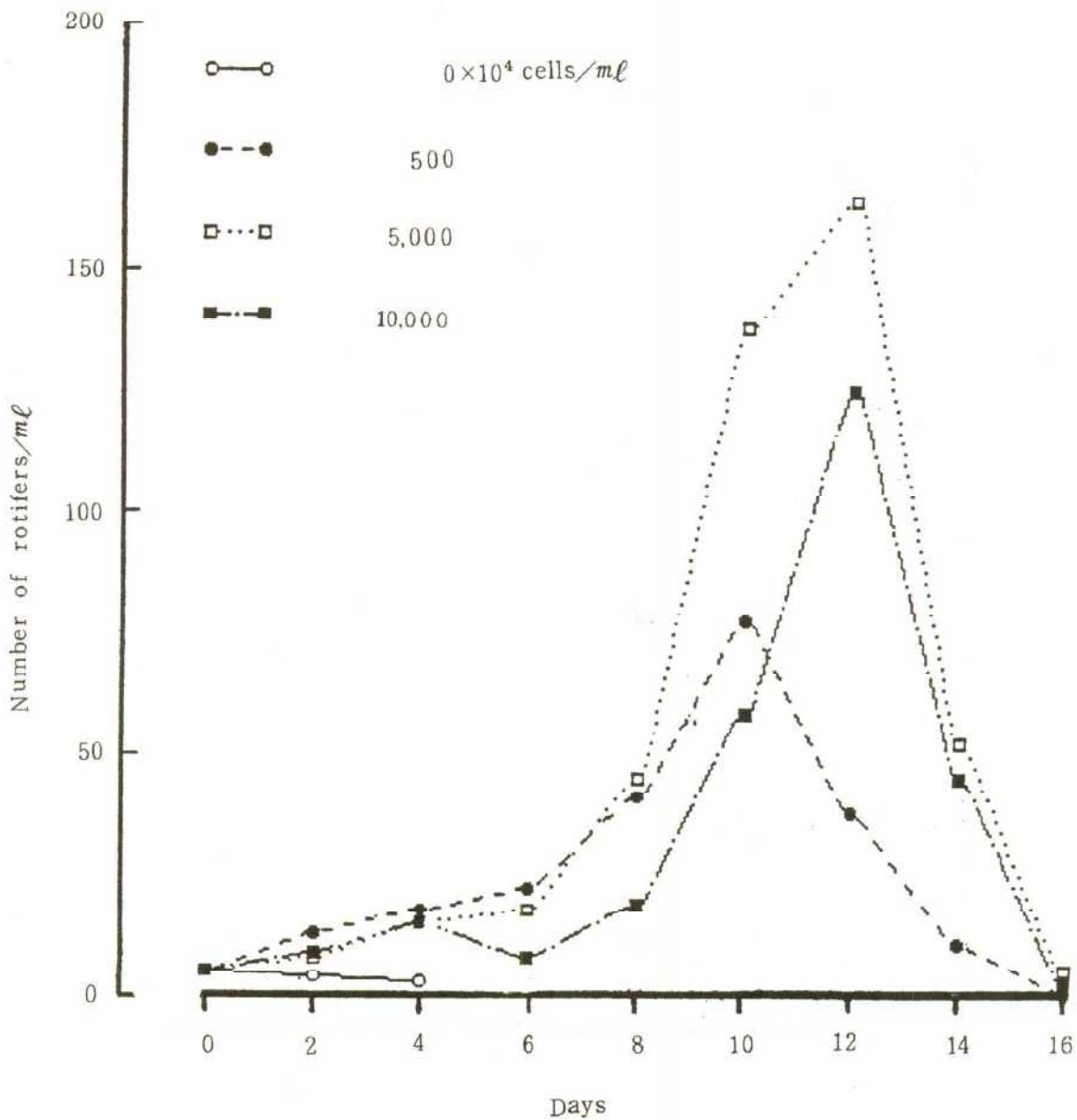


図5 *S. quadricuada* を給餌した *B. calyciforus* の増殖経過

S. quadricuada の給餌濃度が 500×10^4 cells/ml 区では、10日目まで *B. calyciforus* の増殖がみられ、最大増殖密度 78 個体/ml に達した。最大増殖密度に到るまでの増殖率は 1.10 であった。 $5,000 \times 10^4$ cells/ml 区及び $10,000 \times 10^4$ cells/ml 区では、共に 12 日目まで増殖し、最大増殖密度はそれぞれ 165, 126 個体/ml に達し、この期間の増殖率は 1.11, 1.10 であった。

B. urceolaris 及び *B. calyciforus* とも最大増殖密度に達した後は、ワムシ密度の減少が認められる。*B. urceolaris* の最大増殖密度及び増殖率は、*S. quadricauda* の給餌濃度の増加に伴い、高くなる傾向がみられる。*B. calyciforus* でも同様な傾向がみられる。しかし、給餌濃度の増加に伴い、最大増殖密度及び増殖率の増加が認められるのは、 $5,000 \times 10^4$ cells/ml までで、 $10,000 \times 10^4$ cells/ml 区では若干低下する。

また、*B. urceolaris* 及び *B. calyciforus* とも最大増殖密度に到達する日数は、給餌濃度が高い方が期間を要する傾向がみられる。

考 察

単細胞緑藻 *S. quadricauda* の粗放的培養

S. quadricauda は、既存の施肥培養液（硫酸 10g、過磷酸石灰 2g/100ℓ）の濃度を 10 倍に高めても増殖傾向に差はなかったことから、施肥量を増やすことによって増殖量の増大させることは期待できないといえる。また、混合化成肥料を添加した施肥培養液でも既存の施肥培養液と同様に良く増殖することがわかった。

化成肥料に含まれる硫酸カリの添加効果については明らかでないが、今回の各試験区における *S. quadricauda* の最大増殖濃度は 430 ~ 465 cells/ml の範囲で大差は認められなかったことから、本種の施肥培養液処方には窒素及びリン酸がある程度含まれていれば、その組成については特に注意を払う必要はないものと思われる。よって、*S. quadricauda* の培養に際しては、硫酸や過磷酸石灰を 10 : 2 の割合で添加する必要はなく、市販の農業用混合化成肥料を用いて十分に培養することは可能であり、施肥処方が簡素化できるものと考えられる。

また、*S. quadricauda* は最大増殖濃度に達した後、その細胞濃度が維持されずに減少が認められる。これの対処方法としては、追肥によって細胞濃度を維持していくことを検討したほうがよいものと考えられる。

次に、*S. quadricauda* の増殖傾向は、今回の高水温期と低水温期における培養実験では、大差が認められないことから、本種は周年を通して粗放的に培養できるといえる。ただし、本種の増殖可能な水温の下限は 5℃ 付近にあることが報告されている（柳田 1990）ことから、冬期の低水温期に使用する際は、水温が 5℃ 以下に低下する前にある一定濃度まで増殖をさせ、細胞濃度を維持していくことで対処できるものと考えられる。

さらに、*S. quadricauda* はコンクリート水槽でも培養できることがわかった。微小藻類をコンクリート水槽等で大規模に培養すると、増殖に伴い、水槽内部の照度が不足して増殖が停滞することが指摘されている（原 1987）。しかし、本実験では、水槽の上部からだけしか光が当たらないコンクリート水槽での増殖が側面からも光の当たる透明ポリカーボネイト水槽に比べて高かった。その原因は、水深を 0.5 m と浅く設定したこと及び通気を強くしたことによって、培養水が攪拌され、

照度条件が充分満たされたことによるものと考えられる。

今回の実験結果から、*S. quadricauda* を大型水槽を用いて培養する場合は、水深を浅く、通気を強くして攪拌をよくすることが必要であろう。

淡水産ワムシ類に対する餌料としての有効性

顕微鏡観察の結果、*B. calyciforus* 及び *B. urceolaris* は *S. quadricauda* を取り込んでいることが確認され、これらツボワムシ類は、無給餌区を除く全ての実験区で増殖が認められた。これらの結果から判断すると、*S. quadricauda* はツボワムシ類に対して餌料として有効であることが確認された。

B. urceolaris の最大増殖密度は *S. quadricauda* の給餌に伴い、高くなる傾向を示している。また、*S. quadricauda* を給餌した後、最大増殖密度は高濃度給餌区ほど高かったが、増殖率は給餌濃度が $10,000 \times 10^4 \text{ cells/ml}$ では低下したことから、ツボワムシ類に適正な給餌濃度は $5,000 \sim 10,000 \times 10^4 \text{ cells/ml}$ の範囲にあるものと考えられる。*B. calyciforus* の $10,000 \times 10^4 \text{ cells/ml}$ 給餌区における最大増殖密度と増殖率は、 $500 \times 10^4 \text{ cells/ml}$ 給餌区の数値を下回することは認められないので、過剰給餌の影響は少ないものと考えられる。

S. quadricauda を給餌してツボワムシ類を培養する場合、過剰給餌の影響は少ないことから、必要とするワムシ類の増殖量（収穫量）に応じて、給餌量を決めてよいものと思われる。

一方、ツボワムシ類は最大増殖密度に達した後、その密度が維持されずにワムシの個体数が減少している。これは、batch 式培養法では培養期間中に飼育水を交換しないため、ワムシ類の排泄物等によって水質の悪化を招くことにより起るものと推察される。この水質の悪化によるワムシ類の密度低下については、北島（1983）、岡内（1988）、杉本（1989）がシオミズツボワムシについて同様の結果を報告している。

一般に、シオミズツボワムシの batch 式培養法では、増殖密度が最高となる時点でワムシを回収して、稚仔魚の餌料として使用されており、今後、淡水産ワムシ類についても batch 式培養法で計画的に培養するには *S. quadricauda* の給餌量及びワムシの接種密度と最大増殖密度に達する時期の関係を明らかにしたうえで、ワムシの植え継ぎ期間を決定する必要がある。

要 約

単細胞緑藻 *Scenedesmus quadricauda* の大規模培養と淡水産ワムシに対する餌料としての有効性について検討を行った。

- (1) *S. quadricauda* は、既存の施肥培養液（硫安 10g，過磷酸石灰 2g/100ℓ）の濃度を 10 倍に高めても増殖傾向に差はなかったことから、施肥量を増やすことによって増殖量を増大させることは期待できないといえる。
- (2) *S. quadricauda* は、混合化成肥料を添加した施肥培養液でも既存の施肥培養液と同様に良く増殖することから、その組成については特に注意を払う必要はないものと思われる。よって、

S. quadricauda の培養に際しては、市販の農業用混合化成肥料を用いて十分に培養することは可能であり、施肥処方が簡素化できるものと考えられる。

- (3) *S. quadricauda* の増殖傾向は、今回の高水温期と低水温期における培養実験では、大差が認められないことから、本種は周年を通して粗放的に培養できるといえる。
- (4) *S. quadricauda* の増殖傾向は、培養器の大きさや材質による違いが認められなかった。コンクリート水槽で培養する場合は、水深を浅く設定したこと及び通気を強くしたことによって、培養水が攪拌され、照度条件が充分満たされるものと考えられる。
- (5) 顕微鏡観察の結果、*B. calyciforus* 及び *B. urceolaris* は *S. quadricauda* を取り込んでいることが確認され、これらツボワムシ類は、無給餌区を除く全ての実験区で増殖が認められたことから、*S. quadricauda* はツボワムシ類に対して餌料として有効であることが確認された。
- (6) *S. quadricauda* を給餌してツボワムシ類を培養する場合、過剰給餌の影響は少ないことから、必要とするワムシ類の増殖量（収穫量）に応じて、給餌量を決めてよいものと思われる。

文 献

- Miyazaki, T, Wang, S. L, Hara, Y, and Maekawa, T 1985, Growth of the Anmonium-Tolerant Green Alga *Scenedesmus quadricauda* in Methane-Fermentation Effluents, and Removal of Anmonium and Phosphate in the effluents by the Alga, pp. 29-34, The journal of The Society of Agricultural Structure No. 33.
- 堀 直・位田俊臣 1977, ワカサギの人工種苗生産技術の開発に関する研究-I-仔魚が摂餌可能な餌の大きさなどについて-, pp. 11-19, 茨城県内水面水産試験場調査研究報告第14号。
- 佐々 勤 1965, 微小藻類の成育, pp. 195-203, 藻類実験法(田宮 宏・渡辺 篤編) 南江堂, 東京。
- 岡内正典 1988, テトラセルミス *Tetraselmis tetrahele* (West, G. S.) Butcher の大量培養に関する研究, pp. 1-123, Bull. Natl. Res. Inst. Aquaculture No. 14.
- 柳田洋一 1990, 単細胞緑藻類 *Scenedesmus quadricauda* の増殖特性について, pp. 36-41, 茨城県内水面水産試験場調査研究報告第26号。
- 原 慶明 1987, 餌料藻類の分離と培養, pp. 8-17, 昭和62年度栽培漁業技術研修事業基礎理論コース餌料生物シリーズ No. 2, 日本栽培漁業協会。
- 北島 力 1983, 実施例と問題点, pp. 102-128, シオミズツボワムシ生物学と大量培養(日本水産学会編), 恒星社厚生閣, 東京。

杉本 洋 1989, ワムシ密度の急減現象の原因究明, pp. 167-174, 初期餌料生物-シオミ
ズツボワムシ (福所邦彦・平和和次編), 恒星社厚生閣, 東京。