

ビタミンB12含有クロレラ給餌によるシオミズツボワムシの開放培養

誌名	水産増殖 = The aquiculture
ISSN	03714217
著者	丸山, 功 金丸, 彦一郎 中村, 展夫
巻/号	38巻3号
掲載ページ	p. 227-231
発行年月	1990年9月

ビタミンB₁₂含有クロレラ給餌によるシオミズ ツボワムシの開放培養

丸山功^{1), 3)}・金丸彦一郎²⁾・中村展男²⁾
安藤洋太郎¹⁾・平山和次³⁾

(¹⁾クロレラ工業株式会社・²⁾佐賀県栽培漁業センター・³⁾長崎大学大学院海洋生産科学研究科)

Effect of Vitamin B₁₂-enriched *Chlorella* as a Food for Mass Production of the Rotifer, *Brachionus plicatilis*

Isao MARUYAMA, Hikoitirou KANAMARU, Nobuo NAKAMURA,
Yotaro ANDO, and Kazutsugu HIRAYAMA

常法の培地で培養した淡水クロレラ, *Chlorella vulgaris*, (以下クロレラ)はビタミンB₁₂の含量が低い
ため, シオミズツボワムシ, *Brachionus plicatilis*
(以下ワムシ)を無菌培養するとその餌料価値は低
い¹⁾。しかし, クロレラの細胞内にビタミンB₁₂を
含有させるとその餌料価値が著しく高まることが明らか
になった¹⁾。従来は, 常法により培養したクロレラを
ワムシ大量培養用餌料として使用していたが, このビ
タミンB₁₂をほとんど含まないクロレラでも大量培養
が可能であったのは, ワムシ培養槽に混在する細菌に
よりビタミンB₁₂が供給されていたためと考えられる。
クロレラにビタミンB₁₂を含有させるならば, ワムシ
培養にビタミンB₁₂生産菌の助けを必要としないため,
ワムシの培養が安定し, 大量培養用餌料としてもすぐ
れたものになると考えられる。本研究においては, ク
ロレラと安価なワムシ大量培養餌料であるパン酵母を
併用してワムシ開放培養を行い, ビタミンB₁₂含有ク
ロレラの効果を調べた。

材料および方法

ワムシの餌料 クロレラ (*Chlorella vulgaris* K-

22)は炭素源としてグルコースを加えた培地中で振盪
培養した²⁾。培養容器として5,000mlのフラスコを用
い, 白色蛍光灯によって5,000luxの照射をした。細
胞内にビタミンB₁₂を含有したクロレラを培養するた
めには, 培地にビタミンB₁₂を30 μg/l添加した²⁾。
培養を終了したクロレラは, 遠心分離 (3,500回転/
分)によって乾燥重量で100 g/lになるように濃縮
し, 冷蔵保存した。パン酵母はカネカイースト (鐘淵
化学)を用いた。乾燥重量は餌料の一定量を105°Cで2
4時間乾燥し測定した。

ワムシの培養 ワムシはナンノクロロプシス, *Nanno-
chloropsis oculata*, とパン酵母の併用で培養した
S, L型混合ワムシを用いた。2/3に希釈した海水を
使用し, 培養容器として100 lパンライト水槽 (培養
液量90 l)を用い, 通気培養を行った。植え継ぎの日
にのみクロレラを給餌し, その他の日はパン酵母を給
餌した。3日または4日毎に植え継ぎ, 32日間にわた
って10回の培養を行った。パンライト水槽は4個用意し,
2個はビタミンB₁₂含有クロレラとパン酵母を給餌し,
他の2個は常法により培養したクロレラとパン酵母を
給餌した。期間中の水温は25.8~27.4°Cであった。毎

受領日: 1990 (H2) 年3月10日

索引語: クロレラ/シオミズツボワムシ/ビタミンB₁₂

連絡先: 〒833 筑後市久富 1343 クロレラ工業株式会社 丸山功

Address: I. MARUYAMA, Chlorella Industry Co. Ltd., 1343, Hisatomi, Chikugo, Fukuoka 833, Japan

日1回給餌とワムシ個体数の測定を行った。クロレラはワムシ100万個体当たり3.5~4.5mlを、パン酵母はワムシ100万個体当たり1.0~1.7gを給餌した。

ビタミンB₁₂の分析 使用した餌料、海水および培養期間中のワムシのビタミンB₁₂含量を測定した。ワムシはナイロンプランクトンネット(63μm)で集めた後、海水および淡水で洗浄し、分析用の試料とした。試験終了後にはワムシを除いた培養液のビタミンB₁₂濃度も分析した。試料はすべて分析する時まで凍結(-15℃)して保存した。試料からのビタミンB₁₂の抽出および定量的方法は前報²⁾に従った。

結 果

ワムシの増殖 図1に培養期間中のワムシの増殖を示した。すべての水槽で32日間の連続的なワムシ生産が可能であった。ワムシの増殖は、全般的にビタミンB₁₂含有クロレラを給餌した方が良好な傾向がみられ、特に4~7日目および20~23日目の培養ではすぐれて

いた。ビタミンB₁₂含有クロレラとパン酵母を給餌した水槽は、試験期間を通してワムシの増殖は安定していたのに対し、常法により培養したクロレラとパン酵母を給餌した水槽は、7日目、11日目、26日目にワムシ密度の減少が認められ、不安定であった。特に試験の初期の頃は培養が不調であり、8日目には残餌があったために給餌量を減らし、11日目にはワムシが弱っていたため植え継ぎの時のワムシ密度を高くした。試験期間中の総ワムシ生産個体数もビタミンB₁₂含有クロレラを与えた方がまさっていた(表1)。餌料はほぼ同量給餌しているため、餌料1gで生産されるワムシ数もビタミンB₁₂含有クロレラの方がすぐれていた。

使用した餌料および海水のビタミンB₁₂ 常法により培養したクロレラおよびパン酵母のビタミンB₁₂含量は低かった。ビタミンB₁₂含有クロレラは450μg/100g乾燥重量であった(表2)。使用した海水のビタミンB₁₂は検出されなかった。

ワムシおよび培養海水のビタミンB₁₂濃度 ワムシ

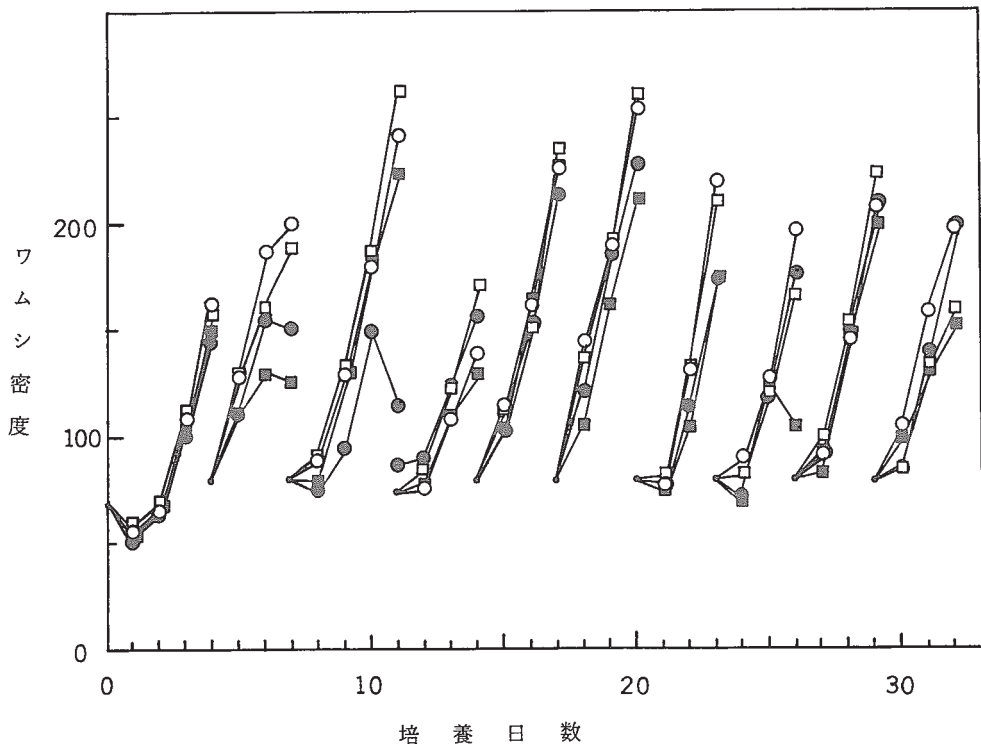


図1 試験期間中のワムシの増殖

植え継ぎの日にクロレラを給餌し、その他の日はパン酵母を給餌した。

○, 水槽1; □, 水槽2: ビタミンB₁₂高含有クロレラ(ビタミンB₁₂を添加した培地を用いて培養)を給餌した。

●, 水槽3; ■, 水槽4: 常法により培養したクロレラ(ビタミンB₁₂を添加しない培地を用いて培養)を給餌した。

表1 培養期間中の総給餌量, ワムシの総生産個体数および使用した餌料に対するワムシ生産個体数

使用餌料	水槽	クロレラ		パン酵母		総給餌量 (クロレラ+ パン酵母) (g乾重)	ワムシ 総生産 個体数 (×10 ⁷ 個体)	餌料1gで 生産された ワムシ数 (×10 ⁶ 個体)
		(mℓ)	(g乾燥* ³)	(g湿重)	(g乾重* ⁴)			
ビタミンB ₁₂ 高含有ク ロレラ* ¹ とパン酵母	水槽1	285	28	323	168	196	11.37	5.8
	水槽2	285	28	320	166	194	11.39	5.9
常法により培養したク ロレラ* ² とパン酵母	水槽3	285	28	303	158	186	9.01	4.8
	水槽4	285	28	312	162	190	8.41	4.4

*1 ビタミンB₁₂を添加した培地を用いて培養し, ビタミンをクロレラ細胞に取り込ませた。

*2 ビタミンB₁₂を添加しない培地を用いて培養した。

*3 容積 (mℓ)×0.10 (g乾重/mℓ)

*4 湿重 (g)×0.52 (g乾重/g湿重)

表2 使用した餌料のビタミンB₁₂含量

使用餌料	ビタミンB ₁₂ 含量	
	(ng/gまたはmℓ)	(μg/100g乾燥重量)
ビタミンB ₁₂ 高含有クロレラ	450	450
常法により培養したクロレラ	0.06	0.06
パン酵母	0.22	0.043

表3 培養期間中のワムシのビタミンB₁₂含量

使用餌料	水槽	ビタミンB ₁₂ 含量 (pg/個体)			
		開始	7日目	20日目	32日目
ビタミンB ₁₂ 高含有 クロレラとパン酵母	水槽1	0.81	1.4	1.4	1.5
	水槽2	0.81	1.8	1.5	1.6
常法により培養した クロレラとパン酵母	水槽3	0.81	1.4	0.89	0.59
	水槽4	0.81	1.5	0.62	0.73

のビタミンB₁₂含量は, ビタミンB₁₂含有クロレラを給餌した場合約1.5pg/個体で安定していたが, 常法により培養したクロレラを与えたワムシは低い場合があり, 変動も大きかった (表3)。培養終了時のワムシ槽の総ビタミンB₁₂濃度は, ビタミンB₁₂含有クロレラを与えた場合, 500pg/mℓ程度であり, その約半量がワムシ中に存在していた (表4)。通常のクロレラを与えた場合のワムシ槽の総ビタミンB₁₂は200

pg/mℓ程度であり, その半量以上がワムシ中に存在していた。

考 察

餌料としてナンノクロロプシスとパン酵母を用いるワムシの大量培養では, ワムシに必要なビタミンB₁₂は, ナンノクロロプシス細胞から培養開始時に16pg/mℓ程度供給され, その後混在するビタミンB₁₂生産

表4 培養終了時(32日目)のワムシおよび培養液のビタミンB₁₂濃度

使用餌料		ワムシおよび培養液のビタミンB ₁₂ 濃度 (pg/ml)		
ビタミンB ₁₂ 高含有 クロレラとパン酵母	水槽1	ワムシ(1.5×198)* ¹	297	計597
		培養液* ²	300	
	水槽2	ワムシ(1.6×169)	270	計490
		培養液	220	
常法により培養した クロレラとパン酵母	水槽3	ワムシ(0.59×203)	120	計164
		培養液	44	
	水槽4	ワムシ(0.73×155)	113	計198
		培養液	85	

*1 ワムシのビタミンB₁₂含量 (pg/個体) × 培養終了時の個体密度 (個体/ml)*2 プランクトンネット濾液のビタミンB₁₂濃度

菌によりさらに大量に供給されることが報告されている³⁾。ナンノクロロプシスの代替餌料として広く使用されているクロレラは、常法により培養した場合ビタミンB₁₂含量が低く、培養開始時にワムシ槽に供給されるビタミンB₁₂は0.02pg/ml程度であった。したがってワムシは増殖に必要なビタミンB₁₂を全て細菌に依存しなければならない。一方、今回試験したビタミンB₁₂含有クロレラを用いると、培養開始時に150pg/ml程度のビタミンB₁₂が供給される。ワムシが増殖するためには100pg/ml以上のビタミンB₁₂が必要であると報告されており⁴⁾、ほぼ増殖可能な量を供給することができる。

今回の試験では、クロレラ細胞にビタミンB₁₂を含有させることにより、ワムシの増殖を安定させる効果が認められた。その結果として、試験期間中の総ワムシ生産個体数も、ビタミンB₁₂含有クロレラを給餌した方がまさっていた。このような効果は、ワムシ培養水槽の細菌によるビタミンB₁₂生産に依存しており、ビタミン生産が不十分な場合大きな効果がでると考えられる。ビタミンB₁₂を含まないクロレラを使用した場合、特に試験の初期の頃にワムシの増殖は不安定であった。材料としたワムシはナンノクロロプシスとパン酵母で培養したものであり、餌料を変えたためにビタミンB₁₂生産菌の状態が不安定になった可能性も考えられる。

ワムシのビタミンB₁₂含量は、ビタミンB₁₂含有クロレラを給餌することにより約1.5pg/個体で安定しており、その値は干ら³⁾の報告とも一致した。常法により培養したクロレラを給餌した場合は値が低く、変動も大きかった。また終了時の培養液のビタミンB₁₂

濃度は、ビタミンB₁₂含有クロレラを給餌した場合、220pg/ml以上であった。この値は餌料から投入された量に比べて多く、この他にワムシが消費したのもあるので、細菌によりかなりのビタミンB₁₂が生産されていると考えられる。常法により培養したクロレラを給餌した時の培養液のビタミンB₁₂濃度は、85pg/ml以下と低かった。餌料および海水からほとんど供給されないで、やはり細菌によりかなりのビタミンB₁₂が生産されていると考えられる。しかしワムシの増殖およびビタミンの分析結果からみて、増殖のためのビタミンB₁₂が不足する場合があったと考えられる。

要 約

ビタミンB₁₂を含有するクロレラは、ワムシ槽に存在するビタミンB₁₂生産菌に依存せずにワムシ培養が可能であるため、大量培養用餌料としてもすぐれていると考えられる。このビタミンB₁₂含有クロレラとパン酵母を併用してワムシ開放培養を行い、その効果を検討した。

- 1) ビタミンB₁₂含有クロレラとパン酵母を給餌した場合、常法により培養したクロレラとパン酵母を給餌したときに比べ、ワムシの増殖は安定しており、試験期間中の総ワムシ生産個体数もまさっていた。
- 2) ビタミンB₁₂含有クロレラとパン酵母を給餌した場合、ワムシのビタミンB₁₂含量は約1.5pg/個体で安定していた。終了時の培養液中には、2つの水槽で300と220pg/mlのビタミンB₁₂が存在していた。
- 3) 常法により培養したクロレラとパン酵母を給餌した場合、ワムシのビタミンB₁₂含量は0.59~1.5pg/個体で変動が大きく、終了時の培養液のビタミン

B₁₂濃度も2つの水槽で44および85pg/mlと少なかった。ビタミンB₁₂は生産菌の状態によっては不足する場合があることが示唆された。

謝 辞

本研究を行うに当たり、ワムシ大量培養におけるクロレラの使用状況について有益な御助言を賜った、広島県水産試験場伏見徹生産部長に深く感謝の意を表します。

文 献

- 1) HIRAYAMA, K., I. MARUYAMA, and T. MAEDA (1989) : Nutritional effect of freshwater *Chlorella* on growth of rotifer *Brachionus plicatilis*. *Hydrobiologia*, 186/187, 39-42.
- 2) 丸山 功・安藤洋太郎・前田直彦・平山和次 (1989) : クロレラによるビタミンB₁₂の取り込みについて. 日水誌, 55, 1785-1790.
- 3) 千 健平・日野明德・宇城正和・前田昌調 (1989) : シオミズツボワムシ大量培養槽におけるビタミンB₁₂収支およびB₁₂生産菌の機能. 日水誌, 55, 1799-1806.
- 4) SCOTT, J. M. (1981) : The vitamin B₁₂ requirement of the marine rotifer *Brachionus plicatilis*. *J. Mar. biol. Ass. U. K.*, 61, 983-994