貝類幼生の餌料としての *Rhodomonas ovalis* NYGAARD について*

岩崎英雄・田中俊輔・藤山虎也

(1971 年 5 月 6 日受理)

On *Rhodomonas ovalis* NYGAARD as Food for Clam Larvae*

Hideo IWASAKI,** Shunsuke TANAKA,***
and Toraya FUJIYAMA**

The present experiments were carried out to find suitable micro-organisms as foods for clam larvae, and thereby meet the demand. Among the five genera of algae used in the experiment, *Rhodomonas ovalis* of Cryptophyceae was found to be the best single food for the larvae of *Scapharca subcrenata* LISCHKE. A mixture of *Rhodomonas ovalis* and *Chromulina* sp. (Chlorophyceae) also provided better growth of the larvae.

Artificial medium and enriched sea water which promote the high growth rate of *R. ovalis* were prepared. Maximal growth of 5.8×10^6 cells/ml or dry weight 270 mg/l was obtained in these media at 20°C, 3,000 lux. A constant population density of a high level ($1 \sim 2 \times 10^6$ cells/ml) was maintained by harvesting 40~60 per cent of the culture in the exponential phase every other day and by replenishing with an equal quantity of the new medium. The old culture (phase of declining relative growth rate) does not maintain the constant level, even if diluted to $1 \sim 2 \times 10^6$ cells/ml.

The principle amino acids of *R. ovalis* are in general agreement with other reports¹⁻³⁾. Glutamic acid showed a comparatively high value. The essential amino acid index⁴⁾ (EAA index) was observed to be 77.0.

近年、種苗生産の目的で各種の有用水産生物の飼育が試みられているが、当面する問題の一つは、初期の餌料であるように思われる。一般に、生物餌料は水質に悪影響を与えないという点で有利であるが、適種の選定や確保などにまだ問題が残されている。著者らは、適当な餌料生物の開発、利用を目的として、貝類の餌料に好適なプランクトンの分離と、能率的な大量培養法について実験を進めてきたが、目的に添った好適な種類が得られたので報告する。

本文に入るに先立ち、アミノ酸分析にご援助下された広島大学宮沢啓輔氏に、また、餌料の栄養価についてご助言を戴いた香川大学岡市友利博士に深く感謝する。なお、本研究の一部は、文部省科学研究費補助金でなされたことを付記し、あわせて感謝の意を表する。

実験方法ならびに結果

サルボウガイ 幼生の餌料試験 新しく分離した *Rhodomonas ovalis* NYGAARD, *Chromulina* sp.

* 本報告の大要は昭和 45 年度日本水産学会年会で発表した。

** 広島大学水産学部 (Faculty of Fish. and Anim. Husb., Hiroshima University, Fukuyama, Japan).

*** 青森県水産増殖センター (Aquicultural Center, Aomori Pref. Hiranai, Aomori Pref. Japan).

Table 1. Growth and survival of larvae of *Scapharca subcrenata* in culture receiving different micro-organisms.

Organisms	Amount of supply/day ($\times 10^3$ cells/ml)	Day		
		0	11	22
Control (natural sea water)		83	108* (22)**	141 (10)
<i>Monochrysis lutheri</i>	1	"	97 (18)	(3)
	2	"	99 (15)	157 (12)
<i>Rhodomonas ovalis</i> + <i>Chromulina</i> sp.***	1	"	124 (36)	230 (34)
	2	"	107 (23)	219 (21)
<i>Rhodomonas ovalis</i>	1	"	127 (39)	212 (23)
	2	"	130 (13)	237 (6)
<i>Haplodinium antjoliense</i>	0.5	"	105 (30)	194 (29)
	1	"	100 (11)	140 (8)
<i>Chromulina</i> sp.	2	"	92 (10)	— (—)

* Growth, mean length in micron.

** Survival rate in per cent.

*** Consisted of equal quantities (by cells number).

Table 2. Culture media composition (w/v) for *Rhodomonas ovalis*.

	SWIR	ASP ₂ R
Distilled water		1000 ml
Filtered sea water	1000 ml	
NaCl		18 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O		5 "
KCl		600 mg
Ca (as Cl ⁻)		100 "
Na ₂ SiO ₃ ·9H ₂ O		150 "
Na ₂ CO ₃		30 "
Urea	100 mg	100 "
KH ₂ PO ₄	2.2 "	2.2 "
P II metals*		30 ml
Fe (as Fe-EDTA)	0.5 "	0.5 mg
Vitamin mix. I**	1 ml	1 ml
NTA		100 mg
TRIS	500 mg	1 g
pH	8.2	8.2

* One ml of P II metal contains: EDTA, 1 mg; Fe (as Cl), 10 μ g; B (as H₃BO₃), 0.2 mg; Mn (as Cl), 40 μ g; Zn (as Cl), 5 μ g; Co (as Cl), 1 μ g.

** One ml of vitamin mix. I contains: B₁₂, 0.5 μ g; biotin, 1 μ g; thiamine HCl, 100 μ g.

Haplodinium antjoliense KLEBS, および, カキの餌料として好結果が得られたといわれる *Monochrysis lutheri* DROOP について, 餌料比較試験を行なった。飼育容器には 2 l 容のビーカーを用い, 飼育海水各 2 l に対し, サルボウガイ (モガイ, *Scapharca subcrenata* LISCHKE) の D 型幼生を 2,000 個体ずつ (1 個体/ml) 入れた。餌料としては, 上記の藻類を単独に, または組合せて, 毎日, 飼育海水 1 ml 当たり 500~5,000 個体になるように与えた。飼育海水には, 福山市筑島沿岸の海水を 2 回砂汙過して用いた。餌料プランクトンとサルボウガイ幼生の生長量, 生存率との関係を Table 1 に示す。餌料としては, *Rhodomonas* と *Chromulina* を組合せて与えたものが生長, 生存率ともによく, 単種では *Rhodomonas* がよかった。 *Monochrysis lutheri* を餌料としたものは予想外に悪かった。

***Rhodomonas ovalis* の培養** *R. ovalis* は人工海水 ASP₂NTA 液でよく増殖し, 窒素源としてはアンモニウム, 尿素が好適であることが知られている⁶⁾。この結果に基づいて, ASP₂NTA 液を *Rhodomonas* 用に若干改良した。さらに, 実用的な見地から, Table 2 に示されるような栄養塩添加海水を処方した。この ASP₂NTA 改良液 (ASP₂R) と栄養塩添加海水 (SWIR) を用い, 20°C, 3,000 lux (1 日 14 時間照明) で静置培養して, 10 日後に 360 万個体/ml, 14 日後には 580 万個体/ml (乾燥重量

Fig. 1. Growth of *Rhodomonas ovalis* in enriched sea water (SWIR) and artificial medium (ASP₂R) with 14 hours illumination, 3000 lux at 20°C. —●—●—, growth in SWIR; —○—○—, growth in ASP₂R.

実験では、2日毎に一定量の培養藻体を培養液とともにとりだし、等量の新培養液を補充する方法をとった。実験の結果を Fig. 2 に示す。すなわち、藻体の密度が 120 万個体/ml の時、隔日に培養量の 20~30% をとり去る場合、細胞密度は約 50 日間増大を続けるが、それ以降は下降して行く。40~60% 除去した場合は、3 カ月間の実験期間ほぼ同水準の細胞密度を維持することができた。

次の実験は、高密度培養を行なうに当たって、間引きを開始するのに適当な生育段階、および、恒常的な

Fig. 2. Effect of harvest every other day on the population density of *R. ovalis* in continuous cultures. The harvest was made together with culture medium in different amounts respectively and the equal quantity of new medium was supplemented. —○—○—, harvesting amount 20%; —●—●—, 30%; —○—○—, 40%; —●—●—, 60%. Cells number was plotted every four day.

270 mg/l の高収量が得られた (Fig. 1)。この実験によつて、*R. ovalis* は栄養塩添加海水でも充分増殖することがわかった。

濃密培養維持に関する実験 所要の餌料を確保し、供給するには、先ず餌料生物を乾燥、または凍結などによる保存が考えられる。ここでは、餌料生物の計画生産を目的に、対数増大期の活力の高い藻細胞を、常時濃密な状態で培養維持することを考え、基礎的な実験を行なつた。前の実験において、20°C、3,000 lux の条件下で培養した場合、対数増大期における *R. ovalis* の 1 日当たりの分裂回数*は 1.0 となつている。したがつて、計算上は、単位時間 (1 日) 毎に、単位時間当たりの藻体の純増加量 (50%) をとりだし、摂取、利用された各栄養塩を補充すれば、所要の増殖密度は恒常的に維持できるはずである。しかし、実際には、利用された各栄養塩の算定も困難であり、老廃物の蓄積も考えられるので、本

高密度培養の維持に好適な細胞密度について知るために行なわれた。すなわち、対数増大期のほぼ中期の 120 万個体/ml の段階と、定常期初期の 380 万個体/ml 段階の培養から、隔日に 40% ずつ間引きを行ない、等量の新培養液を補充して細胞密度の変化を追跡した。結果を Fig. 3 に示す。この実験によつて、定常期初期の 380 万個体/ml から出発した培養では、間引き量は同じでも細胞密度は次第に減少するが、対数期中期からの培養では、ほぼ同水準の細胞密度を維持することがわかった。

以上二つの実験によつて、*R. ovalis* の場合、対数期中期の 120~200 万個体/ml の段階で、隔日に 40~60% とりだし、等量の新培養液の補充すれば、同水準の細胞密度でかなりの長期間、培養を維持できることが明らかになった。

***R. ovalis* のアミノ酸組成** 次に、化学組成の面から餌料としての価値を検討するため、大量培養した *R. ovalis* の粗蛋白、粗脂肪、灰分含量、さらに全アミノ酸組成について分析を行なつた。全窒素

* $D = \frac{1}{0.301t} \cdot \log \frac{N_t}{N_0}$

Fig. 3. Variation of population density in two continuous culture of *R. ovalis*, from which 40% of culture was harvested and the equal quantity of new medium was supplemented every other day. Harvesting was started at the phase of decreasing growth rate in one culture (---○---○---), and at the exponential phase in the other culture (---●---●---).

Table 3. Amino acid composition of *Rhodomonas ovalis*. (Amino acid nitrogen as percentage of the total amino acid nitrogen)

Alanine	7.4	Lysine	4.6
Arginine	5.9	Methionine	2.0
Asparatic acid	9.4	Phenylalanine	5.9
Cystine	0.3	Proline	5.3
Glutamic acid	15.1	Serine	4.1
Glycine	9.4	Taurine	+
Histidine	1.9	Threonine	4.6
Isoleucine	5.3	Tyrosine	3.2
Leucine	9.5	Valine	5.9

光量が減少するためである。したがって、扁平フラスコの使用とか、培養液層を受光面に対し薄くすることなどによつて、かなり高密度まで高い増殖速度を維持することができる。しかし、実用的な面から考えると、増殖速度はそれ程問題ではなく、大量の餌料を確保し、供給できれば充分である。この意味で高密度培養の維持は極めて有用と思われる。実験結果から、この目的に適合する *R. ovalis* の好適密度は $1 \sim 2 \times 10^6$ 個体/ml と考えられる。細胞密度が 4×10^6 個体/ml に達した定常期初期の培養では、間引きの割合が同じでも細胞密度は漸減し、 1×10^6 個体/ml の密度に達しても安定せず減少し続けた。これは一つには藻体の活力の減退、また、有害老廃物の蓄積に起因するものと考えられるが、詳細については不明である。

R. ovalis の主要なアミノ酸組成は、他の藻類¹⁻³⁾のそれと基本的な差異は認められない。他の鞭毛藻ではリジンが多く、*R. ovalis* ではロイシンが多くなっている。珪藻類の主要アミノ酸といわれるセリンは本種では少なかった。貝類に対する餌料価値を比較するのに、必須アミノ酸指数を用いることには議論があると思われるが、一応の指標になると考える。*R. ovalis* はアミノ酸組成からも比較的好適な餌料ということ

はマイクロゲルダール法、粗脂肪はエーテル抽出法、アミノ酸は日立 034 型液体クロマト装置を用いて定量した。その結果、粗蛋白 42.5%，粗脂肪 7.4%，灰分 13.6% の値が得られた。炭水化物については分析を行なっていないが、40%（除灰分、有機物に対して）前後と推定される。アミノ酸量は粗蛋白の 81% となつている。*R. ovalis* のアミノ酸組成を Table 3 に示す。*R. ovalis* の主なアミノ酸は、グルタミン酸、アスパラギン酸、ロイシン、グリシン、アラニンなどで他の藻類と大差ないようであるが、グルタミン酸の多いのが目立つている。必須アミノ酸指数 (EAA index) は 77.2 であつた。

考 察

サルボウガイ幼生の飼育試験は、新しく分離した鞭毛藻の餌料価値を知るために行なつたものである。恒温設備が不備のため流水で温度変化を避けるよう留意したが、昼夜間の温度変化が大きく、生存率への影響は大きかつたように思われる。さらに、貝類幼生の飼育で生存率に大きく影響するのは水換えの方法といわれている。本実験でも水換え法に対する配慮は必ずしも充分でなかつたように思われる。カキ幼生の餌料に好適といわれる *M. lutheri* で好結果が得られなかつたのは意外であるが、これについてはさらに検討を加えたい。

対数増大期における *R. ovalis* の 1 日あたりの分裂回数は、培養を行なつた 20°C , 3,000 lux の条件下では 1.0 となつている。この値は他の鞭毛藻に比べて特に高い値ではないが、炭酸ガス混合の通気を行なえば、さらに高い値が期待できそうである。*R. ovalis* の培養では、細胞密度が 2×10^6 個体/ml を越すと増殖密度が漸減するが、これは主に細胞当たりの受

ができそうである。

文 献

- 1) 荻野珍吉: 本誌, **29**, 459~462 (1963).
- 2) T. R. PARSONS, K. STEPHENS and J. D. H. STRICKLAND: *J. Fish. Res. Bd. Can.*, **18**, 1001~1016 (1961).
- 3) L. CHUECAS and J. P. RILEY: *J. Mar. Biol. Ass. U. K.*, **49**, 97~116 (1969).
- 4) B. L. OSER: in "Protein and Amino acid Nutrition" (A. A. ALBANESE, ed.), 315~332, Academic Press, New York (1961).
- 5) H. C. DAVIS and R. R. GUILLARD: *Fish. Bull.*, **136**, 293~304 (1957).
- 6) 岩崎英雄・岡田義治・田中俊輔: 日本プランクトン学会報, **16**, 140~144 (1969).