

藍藻 *Synechocystis* sp. SY-4の シオミズツボウムシに対する餌料価値の検討

阪本憲司・沖増英治・雨村明倫

福山大学内海生物資源研究所

Dietary Value of a Blue-green Alga, *Synechocystis* sp. SY-4, for the Rotifer, *Brachionus plicatilis*.

Kenji Sakamoto, Eiji Okimasu and Akinori Amemura

(Research Institute of Marine Bioresources, Fukuyama University, Ohama-cho, Inno-shima, Hiroshima 722-21, Japan)

Report Res. Inst. Marine Bioresources, Fukuyama Univ., No.6, 1-9 (1995).

The rotifer, *Brachionus plicatilis*, has been widely used as a food during the first development stages of fishes and crustaceans. The chemical composition, especially, the fatty acid content of the rotifer has been shown to be influenced by diets. An isolated blue-green alga, *Synechocystis* sp. SY-4, was found to be high in quality as a food for the rotifer. However, the levels of ω 3 HUFA in rotifers cultured with SY-4 was not sufficient for the rearing of marine finfish larvae. Therefore, the dietary value of the rotifers must be improved by mixed or secondary culture with *Nannochloropsis oculata*.

シオミズツボウムシ *Brachionus plicatilis* O.F. Muller (以下ウムシと略す) は、専ら仔稚魚生産用の初期餌料として広く用いられている。1965年の飼育餌料への導入以来、大多数の海産魚類稚仔の飼育が可能となった。今日の種苗生産の発展は、ウムシの発見とその後の培養技術の進歩による部分が非常に大きい¹⁾。

現在、ウムシの量産は、真正眼点藻のナンノクロロプシス *Nannochloropsis oculata* と、プラシノ藻のテトラセルミス *Tetraselmis tetrahele* が広く用いられている。ナンノクロロプシスはEPA (エイコサペンタエン酸, C20:5) 含量が高く、その餌料価値が高く評価されているが、梅雨期から夏季にかけて増殖率が低下し、しばしばウムシへの餌料不足が問題となる。これに代わって

導入されたのが耐高温性を示すテトラセルミスで、ワムシ用餌料としての価値が高く評価されている²⁾。

本試験では、さらに安定したワムシの量産を期待し、因島近海より分離した藍藻 *Synechocystis* sp. SY-4³⁾ の餌料価値を、これらの微細藻類との比較により検討した。

実験材料及び方法

1. 使用した微細藻類及びワムシ

Synechocystis sp. SY-4 は、福山大学附属内海生物資源研究所において分離したものである。*Tetraselmis tetrathele* は、西海区水産研究所の岡内正典博士より分譲を受けた。*Nannochloropsis oculata* は、広島県水産試験場より分譲を受けた。ワムシ *Brachionus plicatilis* は、広島県栽培漁業センターより分譲を受けた。

2. 微細藻類の培養方法

各微細藻類の培養は、硫安：80 mg/ℓ，過磷酸石灰：15 mg/ℓ，クレワット32：4 mg/ℓを施肥した培地²⁾で行った。

培養は、23～25℃に設定した恒温室内で、照度 3000 lux（通常 14 時間／日）で通気培養を行った。

3. ワムシに対する餌料価値の検討

① SY-4 を給餌したときのワムシの増殖効果

SY-4は、35℃でも増殖可能な耐高温性を有し、また、細胞直径が 3-5 μm の単細胞性で、ワムシの生物餌料として適当な大きさである。

本試験のワムシは、テトラセルミスで予備培養したものを用いた。各試験区のSY-4の給餌密度は 1×10^5 、 2.5×10^5 、 5×10^5 、 10×10^5 または 20×10^5 cells/mlとし、計5区を設けた。

②各種微細藻類を給餌したときのワムシの増殖効果

本実験では、SY-4のワムシに対する餌料価値を、ワムシ大量培養用餌料として広く用いられているテトラセルミス及びナンノクロロプシスと比較した。

本実験では、テトラセルミスで予備培養したワムシを用い、SY-4 給餌区、テトラセルミス給餌区またはナンノクロロプシス給餌区の計3区を設けた。なお、各種微細藻類の給餌量は、細胞の乾燥重量がほぼ等しくなるように給餌密度を調整した。各種微細藻類の給餌密度は、SY-4が 20×10^5 cells/ml、テトラセルミスが 5×10^5 cells/ml、ナンノクロロプシスが 200×10^5 cells/mlとした。

培養は、1000 ml 容三角フラスコを用い、予備培養と同様に27℃、通気量500 ml/min, 1500 lux 連続照明の恒温室で行った。ワムシは、毎日定時にネットで採取し、各微細藻類の給餌密度を調整した培養液に移して、6日間培養を行った。

4. 各種微細藻類を給餌したワムシの餌料価値の検討

ワムシの海産仔稚魚に対する餌料価値は、水分、蛋白質、糖質、灰分等の成分のほか、脂肪酸組成の違いによって異なることが知られている⁴⁾。多くの海産魚の必須脂肪酸とされている ω 3 高度不飽和脂肪酸⁵⁾の含量が低いワムシを給餌すると、海産仔稚魚の腹部が著しく膨満し、大量斃死を招くことが報告されている⁶⁾。また、ワムシの ω 3 高度不飽和脂肪酸含量は、培養餌料中に含まれる量によって変化することも知られている⁷⁾。

本実験では、SY-4 給餌ワムシ(SY-ワムシ)、テトラセルミス給餌ワムシ(Tet-ワムシ)及びナンノクロブシス給餌ワムシ(Nan-ワムシ)の餌料価値を化学的に評価するために、それらの蛋白質量、糖質量、脂質量および脂肪酸組成を求め、各種微細藻類を給餌したワムシの餌料価値を検討した。

蛋白質の定量

各種微細藻類及び各々の微細藻類を給餌したワムシを、遠心分離(3000 rpm, 15 min)して細胞を集め、蒸留水で3回洗浄した。洗浄細胞を、-30℃で凍結した後凍結乾燥(TAITEC VA-150, VC-960)し、試料として用いた。乾燥重量測定後、試料に蒸留水を3 ml加え、超音波処理(UD-201(株)トミー精工, OUT PUT 3, 1 min \times 5, 水中冷却)を施し、細胞破壊後、蒸留水で50倍希釈した。希釈液1 mlを倍々希釈し、分析用試料を調製した。検量線作成のため、2 mg/ml のウシ血清アルブミン(和光純薬工業(株))を100 μ l 取り、蒸留水 3.9 ml に溶解した。この溶液1 mlを倍々希釈し、標準試料とした。各希釈溶液に、Coomassie Brilliant Blue Protein Assay Reagent (Pierce)を1 mlずつ加え、攪拌後 595 nm における吸光度を測定した。

糖質の定量

各種微細藻類及び各々の微細藻類を給餌したワムシを、遠心分離(3000 rpm, 15 min)して細胞を集め、蒸留水で3回洗浄した。洗浄細胞を、-30℃で凍結した後凍結乾燥(TAITEC VA-150, VC-960)し、試料として用いた。乾燥重量測定後、試料に蒸留水3 ml加え、超音波処理を施し、細胞破壊後、蒸留水で5倍希釈した。希釈液2 mlを倍々希釈し、分析用試料を調製した。検量線作成にはグルコースを標準試料として用いた。グルコース10mgを蒸留水2 mlに溶解し、この溶液を倍々希釈し、標準試料とした。試料中の糖質量はフェノール硫酸法⁸⁾により測定した。各希釈液に、80% フェノール(和光純薬工業(株))を0.05 ml加え、攪拌後、濃硫酸5 mlを加え、さらに攪拌した。10 min 放置後、30℃、15 min保温し、490 nmにおける吸光度を測定した。

脂肪酸の定量及び脂肪酸組成の分析

以下に示すように Blighの方法⁹⁾により細胞から脂質を抽出し、次いで Whiteの方法¹⁰⁾により脂質中のグリセリドを鹼化し、生じた脂肪酸をメチルエステルとして、GC-MS により同定、定量を行った。

各種微細藻類及び各々の微細藻類を給餌したワムシを、遠心分離(3000 rpm, 15 min)して細胞を集め、蒸留水で3回洗浄した。洗浄細胞を、-30℃で凍結した後凍結乾燥(TAITEC VA-150, VC-960)し、試料として用いた。乾燥重量測定後、5mlの溶媒(クロロホルム/メタノール = 1 : 2)を加え、超音波処理を施し、脂溶性物質を抽出した。抽出液を遠心分離(3000 rpm, 15 min, 4℃)後、上澄みを濾紙で濾過して不溶性物質を除いた。その抽出濾液を50ml容ネジ付試験管に取り、N₂封入済のクロロホルムと蒸留水を、全量の4分の1ずつ加え、1分間激しく攪拌した。その溶液を遠心分離(3000 rpm, 15 min)し、上層の蒸留水+メタノール層と、下層のクロロホルム層とに分離させた。上層を除き、下層をナス型フラスコに取り、少量のメタノールを加えた。抗酸化剤 BHT (Butylated Hydroxytoluene, 和光純薬工業株)を 0.005 % (W/V)となるように添加した。エバポレーター(BYELA NAJ-100T, 30℃)で溶媒を除いた後、残渣を溶媒(クロロホルム/メタノール = 1 : 1) 1mlに溶かして、予め重量を測定しておいた4ml容ネジ付試験管に取った。N₂下で溶媒を蒸発させ、全脂質重量を測定した。脂質に 90 % メタノール性 0.3M 水酸化ナトリウムを5ml加え50ml容ネジ付試験管にとり、1時間加熱した。放冷後、等容量の 90 % メタノールを加え、石油エーテル5mlずつで、不鹼化物を抽出した(3回)。メタノール層を6M 塩酸0.3 mlで強酸性とし、遊離脂肪酸を石油エーテル5mlずつで抽出(3回)し、ナス型フラスコに取った。石油エーテルを除いた後、5% 塩酸メタノール(ナカライテスク)を 0.5 ml 加え、N₂封入後、テフロンテープで口を覆い、しっかり蓋を締め、80℃で一夜反応させた。放冷後、蒸留水/ヘキサン = 1 (0.5ml) : 2 (1.0ml)を加え、激しく攪拌した。短時間遠心分離を行い、ヘキサン層(上層)と、蒸留水+メタノール層(下層)とに分離し、ヘキサン層を、4ml容ネジ付試験管に取った。蒸留水+メタノール層に、新たにヘキサンを1ml加え激しく攪拌後、遠心分離してヘキサン層を取った。ヘキサンを N₂ 蒸発させ、さらにヘキサン 500 μ l に溶解して、これを分析用試料とした。

GC, GC-MS condition

GC : HEWLETT PACKARD 5890

GC-MS : Shimadzu GC-9A, GCMS-QP1000

Column : DB-5 (Fused Silica, J & W SCIENTIFIC)
(thin 0.25 μ m, 30 m)

Temp. : 50℃ → 280℃

Temp. rate : 50℃-2 min → 50℃-20℃/min

170℃-3℃/min → 250℃-10℃/min → 280℃

Carrier gas : He

Gas flow rate : 30 ml/min (0.5 kg)

結果及び考察

1. SY-4を給餌したワムシの増殖効果

SY-4を 20×10^5 cells/ml給餌したワムシは、培養開始日から増殖し始め、その後も高い増殖率が認められた。6日目には、1200 numbers/ml のワムシが得られた。また、 10×10^5 cells/ml給餌したワムシも、培養開始日から増殖が見られたが、6日目のワムシの個体数は、600 numbers/mlで、 20×10^5 cells/ml給餌区のその約半数であった。一方、 5×10^5 cells/ml給餌区では、ワムシの増殖は認められたものの、3日目以降の増殖率は低かった。 2.5×10^5 cells/ml給餌したワムシは最高で 230 number/mlと低く、4日目以降の増殖は認められなかった。また、 1×10^5 cells/ml給餌したワムシは、1日目以降の増殖はほとんど認められなかった(Fig. 1)。

これらの結果から、SY-4を 20×10^5 cells/ml給餌したときに、ワムシの増殖が最も高くなることが判った。また、SY-4を摂餌したワムシは運動性に富み、生存率も高かった。

6日間の実験の結果、SY-4の給餌密度(X : 10^5 cells/ml)とワムシの最高増殖密度(Y : numbers/ml) との間には、 $Y=53.74X+45.63(R=0.99)$ の関係式が成立した(Fig. 2)。

2. 各種微細藻類を給餌したワムシの増殖効果

SY-4給餌区及びテトラセルミス給餌区では、培養開始日から増殖が見られた。その後、4日目までは両給餌区において大きな差は認められなかったが、5日目以降 SY-4 給餌区で更に増殖が認められ、テトラセルミス給餌区では定常となった。一方、ナンノクロロプシス給餌区は、やや増殖が見られたものの、その増殖率は低かった(Fig. 3)。

3. 各種微細藻類を給餌したワムシの餌料価値の検討

各種微細藻類で培養したワムシの各成分分析結果を Table 1, 2に示す。

ワムシの蛋白質含量は、Nan-ワムシでやや低いものの、各々に大きな差は認められなかった。また、糖質含量は、Nan-ワムシで比較的低いものの、Tet-ワムシ及び SY-ワムシには、大きな差は認められなかった。これらはいずれも、餌との関係が認められなかった。

しかし、ワムシの脂肪酸含量は、各微細藻の脂肪酸含量を大きく反映する結果が見られた。Nan-ワムシでは高く、SY-ワムシでは低く、その含量はNan-ワムシの約半分量であった。また、各脂肪酸の組成比に総脂肪酸含量を乗じた値(ワムシ中の脂肪酸含量)を比較すると、 $\omega 3$ 高度不飽和脂肪酸の含量は、Tet-ワムシで 0.57 %, Nan-ワムシで 1.35 %, SY-ワムシで 0.16 % であった。Tet-ワムシの $\omega 3$ 高度不飽和脂肪酸含量は、Nan-ワムシの約半分量で、SY-ワムシでは、Nan-ワムシの

約 8 分の 1 量であった。魚類の栄養上重要な、EPA 及び DHA に注目してみると、Nan-ワムシにおいて、EPA が著しく多く含まれ、これは Tet-ワムシの約 10 倍、SY-ワムシの約 5 倍であった。また、DHA も Nan-ワムシで多く含まれ、これは Tet-ワムシの約 25 倍、SY-ワムシの約 6 倍であった。

海産仔稚魚の必須脂肪酸である EPA や DHA などの ω 3 高度不飽和脂肪酸含量は、ワムシ乾燥重量当たりで、Tet-ワムシでは 0.57 %, Nan-ワムシでは 1.35 %, SY-ワムシでは 0.16 % であった。海産仔稚魚用生物餌料としてのワムシに必要とされている ω 3 高度不飽和脂肪酸含量は、0.3-0.5 % とされている²⁾。このことから、Tet-ワムシ及び Nan-ワムシではその量を満たしている。一方、SY-ワムシでは、その量を満たしていないので、脂肪酸組成からみた餌料価値は低いと考えられる。しかし、海産仔稚魚に給餌する前にナンノクロロプシスで二次培養を行えば、十分にその量を満たすことができるものと思われる。

要 約

今回新たに分離した SY-4 のワムシに対する餌料価値の検討を、テトラセルミス及びナンノクロロプシスとの比較により行った。各種微細藻類を、乾燥重量が同量となるように給餌密度を調整しワムシに給餌したところ、SY-4 で非常に高い増殖効果が認められた。また、SY-4 は 35℃ でも増殖可能な耐高温性を示すことから、夏季における餌料不足を十分に補うことができるものと期待される。しかし、SY-4 は ω 3 高度不飽和脂肪酸含量が低いことから、栄養学的な評価は決して高いとは認められず、ワムシの飼育にはナンノクロロプシスなどとの併用給餌が必要であると思われる。

謝 辞

本研究を行うに当たり、テトラセルミス株を分譲して頂いた水産庁西海区水産研究所の岡内正典博士、並びにナンノクロロプシス株を分譲して頂いた広島水産試験場、ワムシを分譲して頂いた広島県栽培漁業センターの方々に厚く感謝の意を表します。

文 献

- 1) 藤田矢郎：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，pp. 9-21(1983)。
- 2) 岡内正典：Bull Natl. Res. Inst. Aquaculture, No. 14, 91-105(1988)。
- 3) 阪本憲司・沖増英治・雨村明倫：福山大内海研報，No. 5, 1-15(1994)。

- 4) 渡辺 武 : 養魚と飼料脂質 (日本水産学会編), 恒星社厚生閣, pp. 93-111(1978).
- 5) Y. Yone and M. Fuji : Bull. Japan. Soc. Sci. Fish. 41 : 71-77(1975).
- 6) 隅田征三郎・尾脇満雄・浦田勝喜 : 熊本水産事業報告書, 熊本水産試験場, 373-382(1974).
- 7) T. Watanabe, C. Kitajima and S. Fujita : *Aquaculture*, 34 : 115-143(1983).
- 8) M. Dubois, K. A. Gilles, J. K. Hamilton, P. A. Rebers and F. Smith : *Anal. Chem.*, 28, 350-356 (1956).
- 9) E. G. Bligh and W. J. Dyer : *Can. J. Biochem. Physiol.*, 37, 911-917(1959).
- 10) J. N. C. White : *Aquaculture*, 75, 193-203(1988).

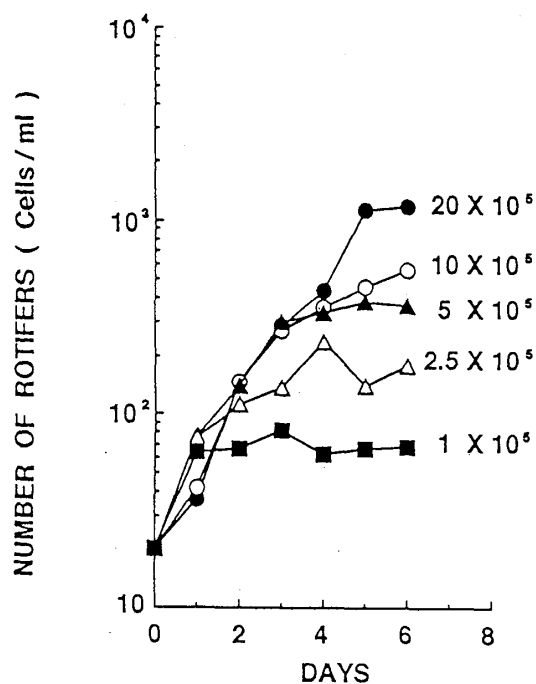


Fig. 1 Population Growth of the Rotifer Fed SY-4 with Various Cell Numbers.

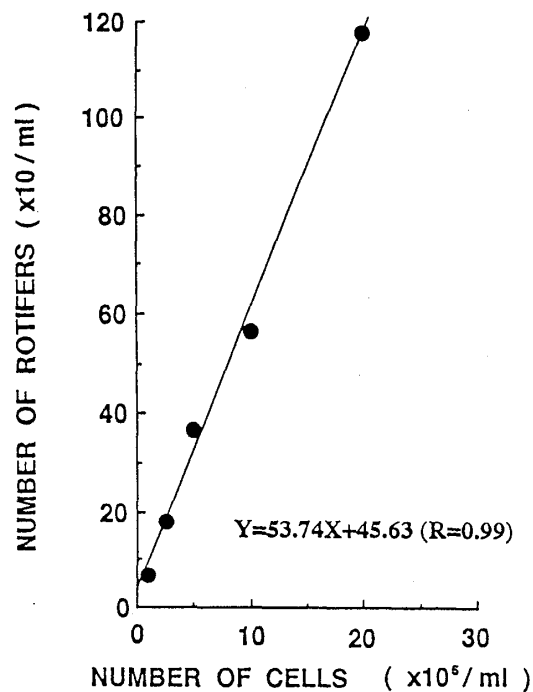


Fig. 2 The Relation Between Feeding Density of SY-4 and Maximum Density of the Rotifer at the Stationary Growth Phase.

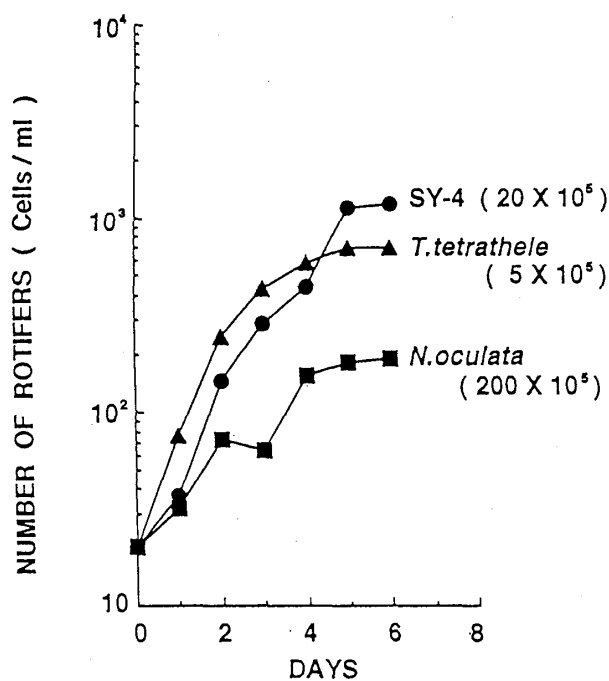


Fig. 3 Population Growth of the Rotifer Fed SY-4, *T. tetrathele* or *N. oculata*.

Table 1. Protein and carbohydrate composition of the rotifers cultured with various feeds. The same dry weight (35 mg) of *Tetraselmis tetrathele*, *Nannochloropsis oculata* or SY-4 was fed.

Component	Composition (%, W/W)					
	Rotifer fed					
	<i>T.tetrathele</i> (T-rotifer)	<i>N.oculata</i> (N-rotifer)	SY-4 (SY-rotifer)	<i>T.tetrathele</i>	<i>N.oculata</i>	SY-4
Protein	44.63	42.79	44.85	28.94	24.19	48.72
Carbohydrate	3.86	2.48	3.56	8.42	9.63	16.42

Table 2. Fatty acid composition of the rotifers cultured with various feeds (% : Expressed as total fatty acid basis).

Fatty acid	<i>T.tetrathele</i>	T-rotifer	<i>N.oculata</i>	N-rotifer	SY-4	SY-rotifer
12:0	1.41	0	0.53	0.07	2.00	0
14:0	0.26	0	3.26	1.82	19.58	0.71
15:0	5.67	0.03	3.35	0.47	9.48	0.71
16:0	18.52	9.75	20.09	19.57	10.64	14.62
16:1 ω 7	2.55	20.44	20.00	13.85	0	0.93
16:1 ω 5	1.59	2.99	0	0	43.79	2.23
16:2	11.94	0.35	0.61	0	0	1.26
16:3 ω 6	0.16	0	0.10	0	0.21	0
16:3 ω 3	1.09	0	0.06	0	0.19	0
18:0	0.11	2.11	1.16	0.31	2.72	4.49
18:1	0.90	8.54	1.83	12.39	0.71	36.52
18:2 ω 6	33.82	3.99	1.40	3.54	0	9.48
18:3 ω 6	0.16	2.42	0.19	0.83	0	0
18:3 ω 3	5.83	1.35	2.06	0.59	0	2.10
18:4 ω 3	6.71	12.58	1.76	3.32	0	0.68
20:0	0.08	1.26	0	0.80	0	1.76
20:1	1.40	0.86	0.81	1.80	0	4.06
20:2	0	0.69	0	0	0	4.96
20:4	0.51	0.62	2.89	2.81	0	0.82
20:5 ω 3	3.96	2.08	32.39	21.97	0	3.99
22:0	0.09	0.06	0.09	0.15	0	0.43
22:1	0	0.38	0	0.32	0	0.33
22:4 ω 9	0	0.12	0	0	0	0.13
22:4 ω 6	0	0.21	0	0.17	0	1.07
22:5 ω 3	0.05	0.21	0	5.03	0	0.88
22:6 ω 3	0.27	0.13	0.26	0.57	0	0.40
24:1	0.07	0	0.10	0.16	0	0.24
$\Sigma \omega$ 3 HUFA*	0.68	0.57	1.68	1.35	0	0.16
Total fatty acid*	3.94	2.46	4.28	3.89	1.57	1.89

* Expressed based on the dry weight.