

# マガキ (Crassostrea gigas) 幼生の成育におよぼす 餌料微生物 (微細藻類, 酵母, 細菌) の影響

雨村明倫・阪本憲司・沖増英治・松本正樹\*<sup>1</sup>

福山大学内海生物資源研究所・太陽化学(株)総合研究所\*<sup>1</sup>

Effect of Planktonic Diets ( Microalgae, Yeast and Bacterium ) on the Growth of Larval Oyster (Crassostrea gigas).

Akinori Amemura, Kenji Sakamoto, Eiji Okimasu and Masaki Matsumoto\*<sup>1</sup>

(Research Institute of Marine Bioresources, Fukuyama University, Ohama-cho, Inno-shima, Hiroshima 722-21, Japan; Central Research Laboratories, Taiyo Kagaku Co.Ltd., Takara-machi, Yokkaichi, Mie 551, Japan\*<sup>1</sup>)

Report Res. Inst. Marine Bioresources, Fukuyama Univ., No.4, 23 - 33 (1993).

Feeding experiments on the larvae of Pacific oyster (Crassostrea gigas) were carried out to find a suitable natural diet for growing of the juvenile in the indoor hatchery. The D-veliger larvae were reared in six 30 ℓ tanks in each experiment (three experiments in all) with 20 ℓ membrane-filtered sea water at 25°C, changing the rearing water every three days over 18 - 24 days. Four microalgae, Chaetoceros gracilis, Chaetoceros calcitrans, Pavlova lutheri and Nannochloropsis oculata, marine yeast MY-1 and photosynthetic bacterium Rhodobacter capsulatus were fed as a single or combined diet once a day in the afternoon. Each diet was supplied with the same cell volume. The results were as follows: C. gracilis, C. calcitrans and P. lutheri were effective in the order to bring a good growth, survival, metamorphose to umbo-veliger and settlement of the larvae. However, N. oculata, MY-1 and R. capsulatus brought a worse growth and survival of the larvae. On the other hand, enhanced survival effects were observed for marine yeast MY-1 fed in either single or mixing with other algae.

広島県におけるマガキの養殖は、その生産高が全国の70%にも及び、県の重要な産業の一つとなっている。しかし、天然採苗に依存しているマガキの養殖は、台風などの自然現象による被害や、水温、プランクトンの量および種類、外敵、海水汚染などの環境条件の影響を受け、その生産は不安定な要因を抱えている。従って、これらの環境条件に左右されない人工的な方法で、安定した種苗生産を行うことが重要である。近年、その人工採苗技術は急速に進歩しつつある。しかし、これらの技術の進歩にもかかわらず、まだ未解決の問題も多く、その中でも有用な幼生の初期餌料生物の探索と餌料生物の安定供給は特に重要な課題であると考えられる。

カキは餌として種々のプランクトンや浮遊固形物を濾過捕食している。その中で珪藻は食物的価値が高く、マガキの成貝は Chaetoceros calcitrans を、ヨーロッパヒラガキの成貝は Chaetoceros gracilis を主たる餌として利用しているとされている。<sup>1)</sup> 本研究では屋内飼育のためのマガキ幼生餌料として、これらの珪藻を中心に、純粋培養が可能で増殖率のよい他の幾つかの微細藻類や海産酵母、光合成細菌を単独および併用給餌し、その効果を幼生の成長率、生残率、変態率、付着率から検討した。

#### 実験材料および方法

供試餌料生物：珪藻 Chaetoceros gracilis (日立造船株式会社より分譲)、Chaetoceros calcitrans、ハプト藻 Pavlova lutheri、真正眼点藻 Nannochloropsis oculata (以上3種は広島県水産試験場より分譲)、光合成細菌 Rhodobacter capsulatus (宝酒造株式会社より供与、凍結細胞製品 PSB)、海産酵母 MY-1 (未同定株、広島県因島沿海より福山大学内海生物資源研究所にて分離)を使用した。Table, Figure あるいは本文において、それらをそれぞれ GRA, CAL, PAV, NAN, PSB, MY と簡略化して使用した。

供試動物：マガキ Crassostrea gigasの成貝 (広島県水産試験場より分譲) を濾過海水を注入しながら水槽中で加温飼育し、生殖巣の成熟期に切開法により採卵、採精を行い、受精させた。受精24時間後の浮遊幼生 (D型幼生) を対象として餌料試験を行った。

幼生の飼育方法：飼育実験は1991年6月5日から6月23日まで (実験 I)、1991年10月20日から11月10日まで (実験 II)、1992年6月4日から6月28日まで (実験 III) の2年次にわたり当研究所の飼育実験室で行った。

海水20ℓの入った30ℓのパンライト水槽に、受精24時間後の浮遊幼生を2個体/mlとなるように収容し、水温25℃で100 ml/minの通気を行いながら止水で飼育を行った。幼生収容日を0日令とし3日毎に換水を行った。ただし、3日令と6日令時は1/3換水、9日以後は全換水とした。飼育海水は精密濾過海水 (三井造船株式会社 MEMCOR 超精密濾過装置、0.2 μm メンブランフィルター) を用いた。

Table 1. Culture media of planktonic diets.

Organism	Medium composition (mg/l)	
<u>Chaetoceros gracilis</u> <u>Chaetoceros calcitrans</u> <u>Pavlova lutheri</u> <u>Isochrysis galbana</u> <u>Isochrysis aff. galbana</u> (T-ISO)	1. NaNO <sub>3</sub>	70
	2. KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	4.5
	3. Na-EDTA	3.3
	4. Fe(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	3.5
	5. Na <sub>2</sub> SiO <sub>3</sub>	50
	6. Clewat-32* <sup>1</sup>	19
	7. Vitamin B <sub>12</sub>	0.001
	Sea water : Distilled water = 4 : 1	
<u>Nannochloropsis oculata</u>	1. (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	65
	2. Urea	6.4
	3. Ca(H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub>	9.6
	4. Clewat-32* <sup>1</sup>	19
	Sea water : Distilled water = 4 : 1	
Marine yeast MY-1	1. Glucose	1.0
	2. Polypepton* <sup>2</sup>	0.25
	3. Yeast extract* <sup>3</sup>	0.1
	Sea water : Distilled water = 4 : 1	

\*<sup>1</sup>(Fe,Zn,Mn,Co,Mo,B)-EDTA, Teikoku Chemical Industry Co. Ltd.

\*<sup>2</sup>Wako Pure Chemicals Co. Ltd.

\*<sup>3</sup>Difco Laboratories.

給餌方法：あらかじめ各餌料生物の平均細胞容積を求め、各試験区に等容積の餌料を与えた。餌料生物の容積比は GRA : CAL : PAV : NAN : MY : PSB = 15 : 15 : 15 : 2 : 30 : 1 であった。給餌に際して残餌量を測定し、飼育水槽内の餌料細胞密度が一定に保たれるようにした。給餌は約 3 時間にわたっての点滴給餌によった。GRA, CAL, PAV の場合、実験開始時の給餌細胞密度を  $5 \times 10^3$  cells/ml とし、3日毎に  $2.5 \times 10^3$  cells/ml ずつ増加して、21日令で  $2.25 \times 10^4$  cells/ml

となるようにした。なお給餌は毎日1回、午後に行った。2種の餌料の併用給餌の場合、両者を1/2ずつ等容混合して用いた。

餌料生物の培養方法：餌料に用いた微細藻類および酵母の培地組成は Table 1 に示した通りである。微細藻類は 10 l のポリカーボネート製の培養瓶を用い、温度 20°C、通気量 1000 ml/min、照射時間 明 14 hr/暗 10 hr、照度 3000 lux で培養した。酵母は 500 ml の坂口フラスコを用い、25°C、往復振とう 100 rpm で培養を行った。いずれも対数増殖中期に細胞を集め、海水に懸濁した後、適当量を給餌した。

幼生成育の測定方法：3日毎の換水時に各試験区より30個体の幼生を無作為に選び、ホルマリン固定した後、顕微鏡でそれらの大きさ（殻長、殻高）を測定し、平均値を求めた。また幼生の生残率、ホタテガイへの付着率も測定した。

藻類の脂肪酸・炭水化物・タンパク質の分析：培養藻類の凍結乾燥試料を分析に用いた。脂肪酸は、まず Bligh の方法<sup>2)</sup>により細胞より脂質を抽出し、次いで White の方法<sup>3)</sup>によりケン化した後メチル化を行い、GC-MS により同定、定量を行った。炭水化物は試料を超音波で破壊後、フェノール硫酸法<sup>4)</sup>によりグルコースを標準として定量した。タンパク質は試料を超音波で破壊した後、Coomassie Protein Assay Reagent (Pierce) によりウシ血清アルブミンを標準として定量した。

## 結 果

実験 I~III の結果を Table 2 と Fig. 1 に示した。Fig. 1 においてマガキ幼生の成長の指標として殻高値を示している。成長の良いものは 15 日令あたりから付着期に入るが、殻高値として示しているのはいずれも浮遊幼生についての平均値である。殻長も殻高とほぼ平行して伸長した。生残率は 0 日令の個体数に対する生残個体数の相対値 (%) で示している。Table 2 において成長率は付着期に入るまでの 1 日あたりの伸長した殻高値で示しており、用いた餌料によって付着期は異なっている。また生残率は実験 I では 18 日令、実験 II では 21 日令、実験 III では 24 日令における値を示している。

実験 I：キートセロス GRA の給餌区では幼生の成長率 (16  $\mu\text{m}/\text{day}$ )、生残率 (18 日令 72%) は共に良好であった。6 日令で生残幼生の 30%、9 日令で 100% がアンボベリジャーに変態し、18 日令ではほぼ 100% が付着幼生となった。キートセロス CAL の給餌区は次いで良好であり (成長率 10  $\mu\text{m}/\text{day}$ , 18 日令生残率 49%)、12 日令でアンボベリジャーへの変態率が 100% となり、18 日令の付着率は 78% であった。ナンクロプシス NAN の給餌区の成長率は低く (4.7  $\mu\text{m}/\text{day}$ )、12 日令でもアンボベリジャーへの変態率は 70% に留まった。18 日令の生残率は 5% にまで減少し、この時期においても付着幼生は見られなかった。光合成細菌 PSB は飼育水槽中でフロックを形成して底面に沈澱する傾向が見られ、餌としてほとんど利用されていないことがわかり、18 日令で全幼生が死滅した。また PSB を CAL, NAN と併用給餌しても成長、生残率に良い効果は見られなかった。

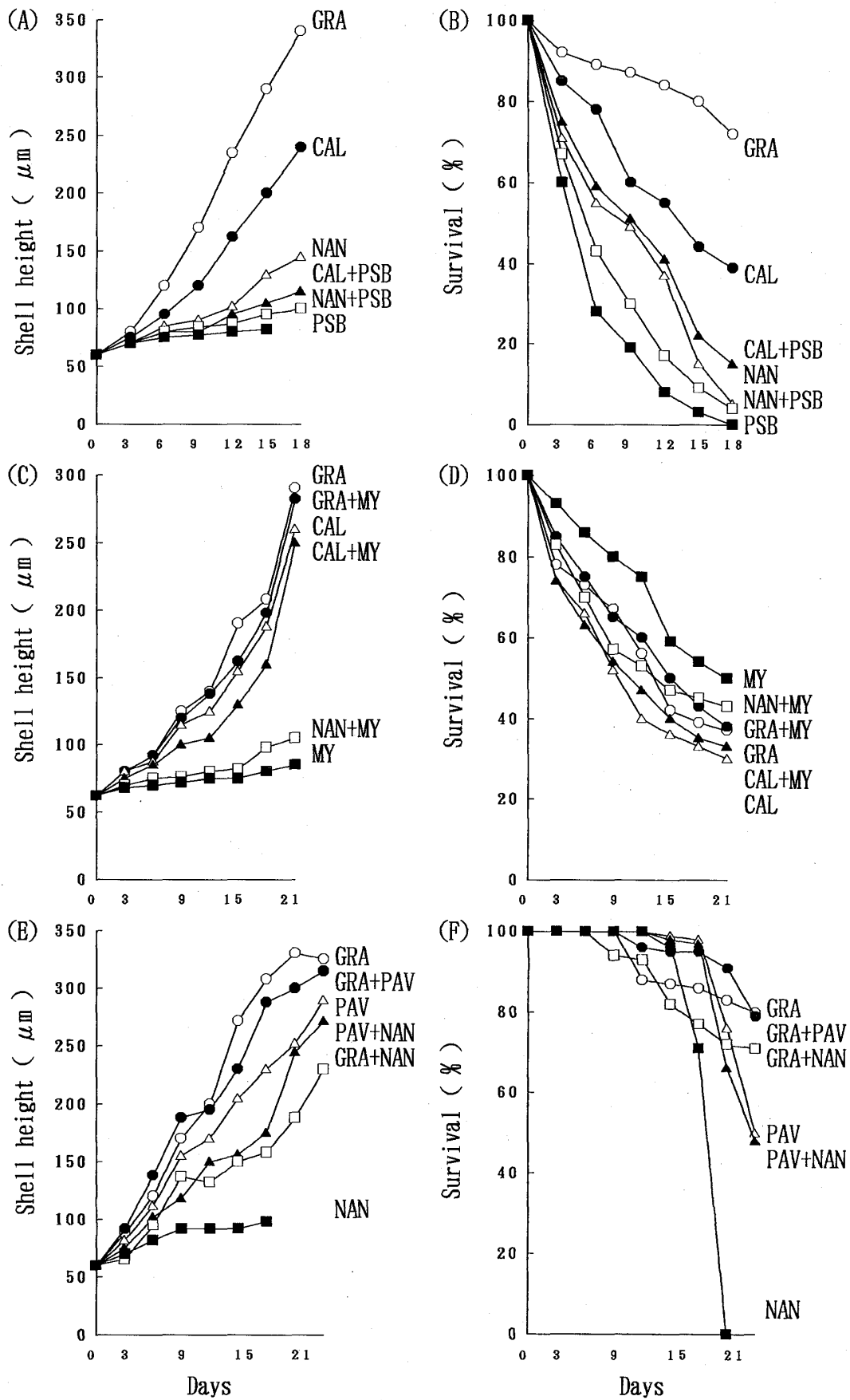


Fig. 1. The growth (A, C, E) and survival (B, D, F) of *C. gigas* larvae fed several diets in Experiments I (A, B), II (C, D) and III (E, F).

Table 2. Survival, growth rate and settlement of *C. gigas* larvae fed several diets.

Exp.	Diet	Survival (%)	Growth rate ( $\mu\text{m}/\text{day}$ )	Settlement (%)			
				Day			
				15	18	21	24
I		Day 18					
	GRA	72	16	14	98	—*1	—
	CAL	49	10	6	78	—	—
	NAN	5	4.7	0	0	—	—
	PSB	0	1.5	0	—	—	—
	CAL + PSB	15	3.1	0	0	—	—
	NAN + PSB	4	2.2	0	0	—	—
II		Day 21					
	GRA	37	11	4	44	85	—
	CAL	31	10	0	23	73	—
	MY	50	0.7	0	0	0	—
	GRA + MY	39	11	0	4	52	—
	CAL + MY	33	9.5	0	2	48	—
	NAN + MY	43	2.0	0	0	0	—
III		Day 24					
	GRA	80	14	17	40	83	97
	PAV	50	9.6	0	6	10	77
	NAN	0	2.1	0	0	—	—
	GRA + PAV	70	12	0	20	57	90
	GRA + NAN	71	7.1	0	0	6	33
	PAV + NAN	48	9.0	0	0	6	23

\*1Not determined.

実験 II：この実験では海産酵母の餌料効果を検討した。この実験に用いた幼生は全般的に生残率が低く、前実験で生残率の高かった GRA 給餌区でも 18日令で 39%、21 日令で 37%（前実験 18 日令 72%）、CAL 給餌区では 18 日令で 33%、21 日令で 31%（前実験 18 日令 49%）であった。次年度の実験においても生残率にそのような傾向が見られた。すなわち、秋季に採卵、受精させて発生した幼生の生残率は夏季のものに比べて低かった。海産酵母 MY の単独給餌区ではほとんど幼生の成長、分化は見られなかったが、21 日令の生残率は 50% と 6 試験区の中で最大であった。また GRA あるいは CAL と MY との併用給餌区では GRA あるいは CAL の単独給餌区に比べやや変態率は低下するもののほぼ同程度の成長を示し、生残率は 37% → 39%、31% → 33% とやや上昇した。NAN と MY との併用給餌区においても実験 I の単独給餌区と比べて成長率は同程度に悪かったが生残率は上昇した（5% → 43%）。このように MY は GRA、CAL と併用する場合には有効な餌料であり、生残率を高める効果があると思われる。

実験 III：本実験ではパブロバ PAV の餌料効果を検討した。PAV は GRA に比べ幼生の成長率、変態率共にやや劣ったが、生残率は 18 日令で 98% と良好であった（GRA は 86%）。しかし、21 日令以降は急速に斃死が起こり、24 日令の生残率は 50% となった（GRA は 80%）。GRA と PAV の併用給餌区は両単独区の間での成長率・変態率値を示したが、生残率は 21 日令でも 90% と単独区より良好であった。また PAV と NAN の併用給餌区においても、これらの値は両単独給餌区における値の中間を示し、PAV との併用給餌による相乗効果は認められなかった。これらのことから PAV は GRA にやや劣る餌料と思われるが GRA と併用することにより生残率を高めることができるものとする。NAN 給餌区は実験 I でも見られたように、成長率、生残率共に悪く、NAN の餌料価値は低いことが明かとなった。

## 考 察

マガキ幼生の初期餌料として硅藻キートセロス（GRA、CAL）、ハプト藻パブロバ（PAV）、真正眼点藻ナンノクロロプシス（NAN）、海産酵母（MY）、光合成細菌（PSB）の 6 種の微細藻類、酵母および細菌の試験を行った。餌料効果は幼生の成長率、生残率、変態率、付着率から評価した。これらの試験生物餌料の中で GRA が最も優れた餌料であり、次いで CAL、PAV が有効であった。NAN、MY、PSB では幼生の成長はほとんど見られなかった。

多くの海産魚介類の初期餌料として、餌料中の脂肪酸組成とりわけエイコサペンタエン酸（20:5 ω3）やドコサヘキサエン酸（22:6 ω3）の含量の高いことが重要であると言われている。これらの海産生物は ω3 系列の高度不飽和脂肪酸を合成できず、いわゆる必須脂肪酸として食物から摂取しなければならないとされているからである。<sup>5-7)</sup> Langdon ら<sup>8)</sup> はマガキ (*C. gigas*) の稚貝について、硅藻 *C. calcitrans*、プラシノ藻 *Tetraselmis suecica*、ハプト藻 *P. lutheri*、緑藻 *Dunaliella tertiolecta* の 4 種の餌料テストを行い、稚貝の成長はこの餌料の順序に従って良いと報

Table 3. Composition of fatty acid, carbohydrate and protein of six microalgae.

Organism	Fatty acid (%)*1	Carbohydrate (%)*1	Protein (%)*1
<u>C. gracilis</u>	3.69	4.91	20.5
<u>C. calcitrans</u>	3.22	7.33	17.7
<u>P. lutheri</u>	4.60	9.41	21.8
<u>N. oculata</u>	5.05	6.39	25.5
<u>I. galbana</u>	3.85	5.39	24.9
<u>I. aff. galbana</u> (T-ISO)	4.95	9.50	20.4

\*1Expressed based on the dry weight.

Table 4. Highly unsaturated fatty acid composition of six microalgae.

Organism	Fatty acid (%)*1	
	20:5 $\omega$ 3	22:6 $\omega$ 3
<u>C. gracilis</u>	15.1	0.34
<u>C. calcitrans</u>	5.90	0.22
<u>P. lutheri</u>	26.5	4.66
<u>N. oculata</u>	32.2	0.07
<u>I. galbana</u>	0.31	5.55
<u>I. aff. galbana</u> (T-ISO)	0.60	6.05

\*1Expressed as total fatty acid basis.

告している。また C. calcitrans, P. lutheri は脂肪酸組成として 20:5 $\omega$ 3, 22:6 $\omega$ 3 を含んでいるが, I. suecica は 20:5 $\omega$ 3 を欠いており, D. tertiolecta は両脂肪酸を欠いている。D. tertiolecta もカキ脂質エキス (20:5 $\omega$ 3, 22:6 $\omega$ 3 を豊富に含む) あるいは 22:6 $\omega$ 3 をカプセル化したものを併用給餌すると稚貝の成長が良くなることから, この緑藻を単独給餌した場合は 22:



6 $\omega$ 3 が稚貝成長の制限因子となっていると述べている。

われわれの用いた餌料の中で GRA, CAL, PAV, NAN および魚介類の種苗生産の餌料として開発されている他のいくつかの藻類の脂肪酸, 炭水化物, タンパク質の含量と脂肪酸組成を Table 3 と Table 4 に示した。GRA, CAL, PAV, NAN の脂肪酸, 炭水化物, タンパク質の含量には大きな差は見られなかった。また高度不飽和脂肪酸組成を比較すると, この 4種の藻類はいずれも 20:5 $\omega$ 3 の含量が高く (6~32%), 22:6 $\omega$ 3 については PAV が高い (4.2%) 以外は低い含量であった。その中で NAN は 0.07% ときわめて低く, NAN の餌料価値の低さはこの 22:6 $\omega$ 3 の低含量に起因しているのかも知れない。NAN はシオミズツボムシの良好な餌料として多用されているが, シオミズツボムシとマガキの初期幼生とは栄養要求性が非常に異なると思われる。

一方, Helm ら<sup>9)</sup> はハプト藻 *Isochrysis aff. galbana* (T-ISO) および硅藻 *C. calcitrans* を 4 種の二枚貝, すなわちマガキ (*C. gigas*), マングローブガキ (*Crassostrea rhizophorae*), アメリカハマグリ (*Mereenaria mereenaria*) とアサリ (*Tapes semidecussata*) の幼生に与えてその成長を測定している。それによれば T-ISO は後二者の clam のみに良好な餌料であり, 一方, 他の藻類はいずれの二枚貝にも有効であったと報告している。また Okauchi<sup>10)</sup> もアコヤガイ (*Pinctadafucata*) の稚貝の育成には T-ISO は *C. gracilis*, *I. galbana* に劣るとしている。T-ISO は上述の他の藻類に比べると 22:6 $\omega$ 3 含量は同じように高いが 20:5 $\omega$ 3 含量が低く, このことがカキあるいはアコヤガイの育成の一制限因子となっていると述べている [われわれの分析では *I. galbana* の 20:5 $\omega$ 3 含量は T-ISO と同様低い (Table 3)]。同じ二枚貝でも種の違いにより 22:6 $\omega$ 3 が重要であったり, あるいは 20:5 $\omega$ 3 が重要であったりしているようであるが, これらの生物の脂肪酸代謝は十分明らかにされていないので, その要求性に関しては今後の研究を待たねばならない。また餌料価値として餌料の脂肪酸組成, 含量のみならず, 炭水化物, タンパク質の組成, 含量, その他の栄養素も重要な因子と考えられ, 餌料の消化性, 毒性, 浮遊性, 形状などと共に総合的に考察する必要がある。

われわれが餌料試験に用いた海産酵母 MY は単独給餌ではまったく育成に効果が見られなかったが, GRA, CAL と併用すれば有効であることがわかった。一方, NAN は単独給餌は勿論のこと併用給餌においてもほとんど餌料価値は見られなかった。また MY には生残率を高める効果が顕著にみられた。酵母は一般に魚介類の育成に必要な脂肪酸含量が低いために, シオミズツボムシの補助餌料として油脂添加酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) が用いられている。門脇ら<sup>11)</sup> はヒオウギガイ (*Chlamys nobilis*) の種苗生産に海産酵母とナンノクロロプシスの併用給餌で良好な結果を得ている。

光合成細菌 PSB はビタミン群が豊富であることから魚介類の補助餌料として検討されており, アカガイの幼生餌料に用いて良好な結果が得られた例もある。<sup>12-14)</sup> また, アンモニアの資化能力が高いことから飼育水の浄化, 安定化にも役立つとされている。<sup>14)</sup> 本研究で用いた PSB は餌料として多量に水槽に加えたためフロックを形成し, 飼育水中に長時間浮遊分散せずに底に沈み易くなり, 餌料としてほとんど利用されなかった。PSB はマガキ幼生の飼育においては餌料としてより

は、アンモニア除去による飼育水の浄化を含めた水質の安定のために使用することを今後検討する必要があると考える。本研究では飼育水としてメンブランフィルターで濾過した無菌海水を用いたが、飼育中の海水の中には常時平均  $10^2$  cfu/ml の細菌が認められた（未発表）。魚介類の飼育水中の微生物相、特に細菌相は病原菌など有害な細菌の発生をおさえるために重要であるという見解もあり、<sup>15)</sup> 有用な細菌を用いたマガキ幼生の飼育水づくりは、有用な餌料の検索と共に今後の重要な課題である。

## 要 約

マガキ (*C. gigas*) 幼生の成長、生残、変態、付着におよぼす餌料生物の影響を検討した。試験餌料生物として硅藻 *Chaetoceros gracilis*, *Chaetoceros calcitrans*, ハプト藻 *Pavlova lutheri*, 真正眼点藻 *Nannochloropsis oculata*, 海産酵母 MY-1, 光合成細菌 *Rhodobacter capsulatus* を用いた。これらを単独給餌した場合, *C. gracilis* が最も優れた餌料であり, ついで *C. calcitrans*, *P. lutheri* が良く, *N. oculata*, 海産酵母, 光合成細菌は餌料として不適當であることがわかった。しかし, 海産酵母を給餌した幼生の生残率は高く, 成長の良い他の餌料と併用することにより, 良好な成長に加えて生残率をさらに高めることが出来た。

## 謝 辞

本研究にあたり, 成ガキの提供ならびに幼生の飼育に関してご教示いただきました広島県水産試験場の方々に深謝します。

## 文 献

- 1) 山口勝己・渡辺勝子・坂下俊行・大坪錠二・岡田 茂・押野明夫・関 哲夫・道川恭子・鴻巣章二: 平成 4 年度日本水産学会秋季大会講演要旨集, p.53 (1992).
- 2) E. G. Bligh and W. J. Dyer: *Can. J. Biochem. Physiol.*, **37**, 911-917 (1959).
- 3) J. N. C. Whyte: *Aquaculture*, **75**, 193-203 (1988).
- 4) M. Dubois, K. A. Gilles, J. K. Hamilton, P. A. Rebers and F. Smith: *Anal. Chem.*, **28**, 350-356 (1956).
- 5) A. Kanazawa, S. Teshima and K. Ono: *Comp. Biochem. Physiol.*, **63**, 295-298 (1979).
- 6) P. M. Colvin: *Aquaculture*, **8**, 81-89 (1976).

- 7) M. Fujii and Y. Yone: Bull. Jap. Soc. Sci. Fish., **42**, 583-588 (1976).
- 8) C. J. Langdon and M. J. Waldock: J. Mar. Biol. Ass. U. K., **61**, 431-448 (1981).
- 9) M. M. Helm and I. Laing: Aquaculture, **62**, 281-288 (1987).
- 10) M. Okauchi: Nippon Suisan Gakkaishi, **56**, 1343 (1990).
- 11) 門脇秀策・中藺貫幸・猪奥繁利・加世堂照男・平田八郎: Mem. Fac. Fish., Kagoshima Univ., **29**, 209-215 (1980).
- 12) 小林達治・川村厚生・大家正太郎・三上郷司・中西 弘・村田清美・衣笠美弘・河杉忠昭: Bull. Jap. Soc. Sci. Fish., **35**, 1021-1025 (1969).
- 13) M. Kobayashi and S. Kurata: Process Biochem., **13**, 27-30 (1978).
- 14) 荻野珍吉: 発酵と工業, **36**, 836-841 (1978).
- 15) 野上欣也・前田昌調: 海洋微生物とバイオテクノロジー, 清水 潮編, 技報堂出版, pp. 169-183 (1991).