

## シオミズツボワムシの栄養強化成績に対する一次培養の方法と 個体群増殖フェーズの影響

小谷知也<sup>a\*</sup>、源河輝久<sup>a</sup>、伏見浩<sup>a</sup>、林雅弘<sup>b</sup>

植え継ぎ及び連続方式で培養したシオミズツボワムシ *Brachionus plicatilis* (以下ワムシ) を栄養強化後の脂肪酸の取り込みにより質的に比較した。植え継ぎ培養は3日周期で植え継ぎを行い、初期収容密度を800個体 /mLとした。粗放連続培養法を改変した方法で連続培養を実施し、培養を行う水槽 (以下培養槽) と培養槽から流出した培養を収容する水槽 (以下収穫槽) を使用した。培養密度が1,000個体 /mLを維持するように設定した。植え継ぎ培養からはワムシ接種後1時間後、24時間後、48時間後のワムシを栄養強化に用いた。連続培養では培養槽及び収穫槽からワムシを収穫し二次培養 (栄養強化) に用いた。栄養強化は、*Nannochloropsis oculata* を給餌して24時間培養する区と、市販栄養強化剤 (以下栄養強化剤) を用いて8時間培養する区を設定した。栄養強化を行わない区も設定した。栄養強化後、脂質を抽出し、ガスクロマトグラフィーにより脂肪酸組成を分析した。栄養強化を行わなかった区では連続培養で生産したワムシの方が脂質含量が多くなった。*N. oculata* で栄養強化した区では、ARAおよびEPA含量が連続培養からの試料で多くなる傾向があった。一方、栄養強化剤で栄養強化した区では、ARA、EPAおよびDHA含量が、植え継ぎ培養の接種24hr後及び連続培養収穫槽からの試料で多くなる傾向があった。したがって、脂肪酸取り込みの効率は、連続培養で生産したワムシの方が植え継ぎ培養のワムシよりも高かった。

キーワード: シオミズツボワムシ、バッチ培養、連続培養、栄養強化、脂肪酸

汽水産ツボワムシ類 (以下ワムシ) は、海産魚類種苗生産で初期餌料として用いられている動物プランクトンである。伊藤<sup>1)</sup> が餌料生物としてワムシを導入してから現在まで、様々な大量培養法について研究が行われ<sup>2-6)</sup>、大量培養法の確立によって仔魚の大量生産が可能になった。<sup>7)</sup> 一方、ワムシが何らかの原因となつて起こる仔魚飼育上の問題が発生するようになった。それらの多くはワムシが含有する栄養組成の欠陥が

---

<sup>a</sup>〒729-0292 福山市学園町1番地三蔵 福山大学生命工学部海洋生物工学科。

<sup>b</sup>〒889-2192 宮崎市学園木花台西1-1 宮崎大学農学部生物環境科学科

\*Tel : +81-84-936-2111, Fax : +81-84-936-2459, E-mail : [tkotani@ma.fuma.fukuyama-u.ac.jp](mailto:tkotani@ma.fuma.fukuyama-u.ac.jp)

原因となるもので、大量斃死や色素異常、体形異常などであった。<sup>8-10)</sup> また、ワムシ培養の不安定性が原因となる問題も発生した。<sup>11)</sup> これまでに、ワムシの栄養組成が原因となるものについては解決されてきており<sup>8-10)</sup>、そのいくつかはワムシの栄養強化法の開発によって解決された。<sup>12, 13)</sup> ドコサヘキサエン酸 (DHA) やエイコサペンタエン酸 (EPA) に代表される n-3 高度不飽和脂肪酸 (highly unsaturated fatty acid, HUFA) は魚類仔魚の成長や活動に極めて重要な役割を果たしていることが Watanabe<sup>14)</sup> により報告された。この報告以降、ワムシの栄養強化に関する研究は、n-3HUFA、特に EPA と DHA に関するものが中心となった。また、ワムシ培養の安定化に関しては培養方法や培養器具などの改良、例えば老廃物除去のためのフィルターの導入や、餌となる淡水クロレラの安定供給、ケモスタット式培養法開発などが行なわれてきた。

友田ら<sup>15, 16)</sup>は、一次培養におけるワムシの増殖フェーズが、それを摂餌した仔魚の成長に影響を及ぼしていることを初めて報告した。これは、環境要因がワムシの生理活性に影響を与えているためであると考えられる。<sup>15, 16)</sup> ワムシの培養で一般的に用いられている植え継ぎ培養法は培養期間中に培養水の交換を行わないため、水質悪化を伴う。さらに、水質悪化はワムシの質に対して影響を及ぼす。<sup>17)</sup> 初期餌料の栄養価によって魚類種苗生産の結果が左右されるため、魚類種苗生産の安定化を図るためには高品位のワムシを供給することが必要となる。近年、多くの種苗生産場で用いられている連続培養法では、培養水と餌となる植物プランクトンの連続供給によって、水質を安定させることが可能となっている。したがって、理論上はワムシの質を安定させることが可能であると考えられている。しかし、連続法で培養されたワムシの質がどの程度高品位で安定したものであるかは不明なままである。また、連続培養法による個体群増殖が植え継ぎ培養法の増殖フェーズのどの部分に相当するかについての知見も極めて少ない。さらに、植え継ぎおよび連続培養法で培養されたワムシを栄養強化した後の栄養価の比較をした報告例はこれまでには見当たらない。

本研究では、植え継ぎ式及び連続培養法で培養されたワムシに対する栄養強化の効果を評価することを目的とした。今回は、各一次培養法で培養したワムシを栄養強化した後の脂肪酸組成を分析することによって栄養価を評価した。

## 材料と方法

シオミズツボワムシ小浜株を材料として用いた。小浜株は旧日本栽培漁業協会（現独立行政法人水産総合研究センター）小浜事業場において 20 年間低水温（10～15℃）で維持されていた株が由来であり、同事業場で高い増殖力を持つ個体群が選抜されたものである。

ワムシの培養には、植え継ぎ培養法と連続培養法を用いた。両培養ではワムシの餌として市販の濃縮淡水クロレラ *Chlorella vulgaris*（日本クロレラ株式会社製）を用いた。水温は  $25 \pm 1^\circ\text{C}$  に調節した。培養水としては 60%希釈海水を用いた。水質を管理するために、pH、溶存酸素濃度及び解離アンモニア濃度を測定した。溶存酸素濃度の測定は DO メーター（Tox-90, 東興化学株式会社製）を用いた。解離アンモニア濃度の測定には、45 $\mu\text{m}$  目合プランクトンネットでワムシを除いた培養水にサリチル酸法に基づいてアンモニア-シアヌレート剤（Cat. 23955-66, HACH<sup>®</sup>）を加え、発色させた後、吸光度を分光光度計で測定した（DR/4000, HACH<sup>®</sup>）。pH 値は pH メーター（HM-30V, TOA エレクトロニクス製）を用いて測定した。毎日個体数密度を測定し、

植え継ぎ培養法では測定した個体密度に基づいて日間増加率を算出した。日間増加率は以下のように定義した。

$$\text{日間増加率 (\%)} = ((D_p - D_{p-1}) / D_{p-1}) \times 100$$

$D_p$ : ある日の個体数密度

$D_{p-1}$ : その前日の個体数密度

**植え継ぎ培養法** 植え継ぎ培養法は 500L アルテミア孵化槽を用いて行った。初期収容密度を 700 個体 /mL とし、餌としてクロレラ *C. vulgaris* を用い、1 日ワムシ 1 個体につき 2 万細胞に相当する量を培養に添加した。セラミック製エアストーン 1 個を用いて強通気を行い、エアストーンは水槽底から 5cm 離して設置した。老廃物を除去するために、4 枚のサランロックフィルター (60x40x2, 田中三次郎商店株式会社) を培養水中に入れた。これらのフィルターを毎日交換して洗浄した。培養は植え継いで 2 日後に終了し、培養の一部を次の新しい培養の元種として使用した。ワムシ個体群は植え継いでから 1、24、48 時間後に収穫し、栄養強化に供した。

**連続培養法** 連続培養法は桑田<sup>18)</sup>の方法を改変して行った。3 つの 500L アルテミア孵化槽と冷蔵庫、18L 容プラスチック製容器、2 つの定量ポンプを 1 つのシステムとして使った (Fig. 1)。2 つのアルテミア孵化槽を 60%希釈海水で満たし、片方には何も接種せず (培養水供給槽: water supply tank)、もう片方には 1,000 個体 /mL となるようにワムシを接種した (培養槽: cultivation tank)。培養槽には淡水クロレラを 2,000 万細胞となるように添加した。塩化ビニル管を 500L の高さになるように調節し、アルテミア孵化槽の中央に立てた。培養槽はもう一つの残りの水槽 (収穫槽: harvest tank) にカナラインホースで接続した。培養水供給槽から培養槽へは定量ポンプ (EBN-B20, (株)イワキ製) を用いて 60%希釈海水を供給した。供給量は 300L /日 (208 mL /分) に調節

培養槽はもう一つの残りの水槽 (収穫槽: harvest tank) にカナラインホースで接続した。培養水供給槽から培養槽へは定量ポンプ (EBN-B20, (株)イワキ製) を用いて 60%希釈海水を供給した。供給量は 300L /日 (208 mL /分) に調節

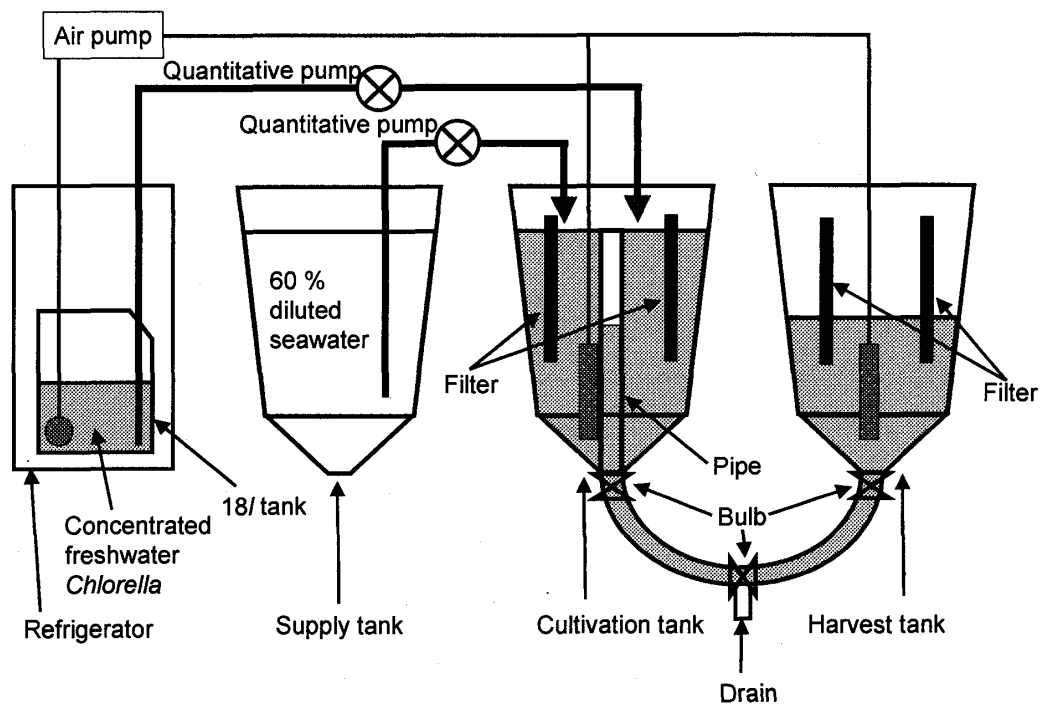


Fig. 1. Schematic explanation of the system of continuous culture modified the method of Kuwada (2000)

した。150億細胞/mLの濃縮淡水クロレラ3.3Lと13.7Lの淡水を混合して冷蔵庫中の弱い通気を施した18L容プラスチック製容器に入れ、この18L容器から培養槽へ定量ポンプで11.8 mL/分の速さで淡水クロレラ懸濁液を供給した。培養槽から溢れ出た培養水は、中央に立てた塩化ビニル管及び収穫槽に繋がるカナラインホースを通して収穫槽へ移動した。培養槽及び収穫槽では、それぞれ1個のセラミック製エアストーンを用いて強通気を行い、エアストーンは水槽底から5cm離して設置した。培養水中の老廃物を除去するために、4枚のサラロックフィルター(60x40x2, 田中三太郎商店株式会社)を培養水中に入れた。これらのフィルターは毎日交換して洗浄した。培養槽及び収穫槽からは必要に応じて栄養強化用のサンプルを収穫した。

**栄養強化** 栄養強化は2つの方法で行った。一つは真正眼点藻綱 *Nannochloropsis oculata* で強化する方法である。*N. oculata* の細胞密度を6,000万細胞/mLに調整した。培養水には60%希釈海水を用い、水温を $25 \pm 1^\circ\text{C}$ に調節した。*N. oculata* を使用した時の栄養強化時間は24時間とした。もう一つの方法では、市販栄養強化剤DHA Protein SELCO (INVE社製)を使用した。栄養強化剤の濃度を0.25g/Lに設定した。この時の栄養強化時間は仕様書通り8時間とした。いずれの方法でも、栄養強化時のワムシの初期収容密度を1,000個体/mLとした。栄養強化後、ワムシ個体群を45 $\mu\text{m}$ 目合プランクトンネット製袋型収穫ネット内で洗浄し、水分を取り除いた後、 $-80^\circ\text{C}$ 冷凍庫内で保存した。各1次培養(植え継ぎ1、24、48時間後; 連培培養槽、収穫槽)から3回収穫し、栄養強化に用いた。対照として、1次培養直後で栄養強化を行わないものも用意した。

**脂肪酸分析** 脂質の抽出はFolch et al.の方法<sup>19)</sup>に基づいて行った。1gの凍結サンプルに一晩真空凍結乾燥を施した。20mLのクロロホルム-メタノール混合溶液(1:2)を上記の乾燥サンプルに加えた後、10分間静置した。その後、90秒間ホモジナイズし、Whatman No. 1濾紙で濾過した。濾液を100mL容ナス型フラスコに収容後、エバポレーター(RE 52, (株)ヤマト科学製)で溶媒を蒸留した。フラスコ底の精製物を15mLのクロロホルムに再溶解し、溶液をWhatman No. 1濾紙で濾過した。濾液を100mL容ナス型フラスコに収容後、エバポレーター(RE 52, (株)ヤマト科学製)で溶媒を蒸留した。精製物を真空凍結乾燥した後、フラスコごと秤量した。精製物は脂質であるので、予め秤量しておいたフラスコ自体の重さとの差から脂質量を算出した。

ガスクロマトグラフィーを行う前に脂肪酸のケン化を行った。抽出した脂質を1mLのクロロホルムに再溶解し、同時に内部標準としてC19:0を2mg/mLとなるように添加した。溶液を10mL容ガラス製遠沈管に入れ、そこに1mLの5%塩酸メタノール溶液(和光純薬製)を加えた。溶液を含む遠沈管を $80^\circ\text{C}$ で3時間加熱した。放冷後、1mLのヘキサンと5.5mLの蒸留水を加え、攪拌した。遠沈管を2,000rpmで2分間遠心分離した後、上方のヘキサン層を1.5mL容スクリー管に移し、脂肪酸分析を行うまで $-80^\circ\text{C}$ 下で保存した。脂肪酸を含むヘキサンをガスクロマトグラフィー機(G-3000, 日立精機株式会社製)に適用し、脂肪酸分析を行った。内部標準の量を基にして各脂肪酸の定量を行った。

1次培養条件間で脂質含量及び脂肪酸含量を比較するためにKruskal-Wallis検定を実施し、有意差が検出された場合にはMann-WhitneyのU検定で多重比較した。

結果

ワムシ密度及び水質

試験期間中、植え継ぎ培養を8回(延べ17日間)、連続培養は27日間実施した(Fig. 2 及び 3)。植え継ぎ培養のワムシ個体群密度は、ワムシ接種時には平均 676 個体 /mL で、24 時間後には 1,066 個体 /mL、48 時間後には 1,204 個体 /mL まで増加した(Table 1)。5 回目の培養(9~11 日目)を除き、すべての培養期間でワムシ接種から収穫までワムシ個体数は増加し続けた(Fig. 2)。また、培養前半(ワムシ接種後 0~24 時間)の平均日間増加率(61.3%)は後半の平均日間増加率(ワム

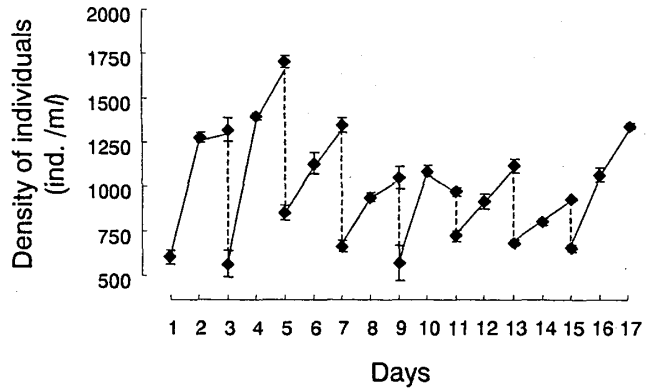


Fig. 2. Change of population density of rotifer in eight times of batch culture. Each solid line indicates successive culture and each broken line indicates re-stocking.

シ接種後 24~48 時間; 13.0%)よりも高かった(Table 1; Mann-Whitney の U 検定, U 値 = 5.0, z 値 = -2.8, p<0.01)。

連続培養では約 750 個体 /mL でワムシを接種した。培養槽中のワムシ密度は 4 日目に最高密度 1,296 ± 43 個体 /mL に到達し、その後 500~1,000 個体 /mL の間を変動した(Fig. 3; Table 2)。収穫槽のワムシ密度は 5 日目に最高密度 1,332 ± 21 個体 /mL に到達し、その後 500~1,000 個体 /mL の間を変動した(Fig. 3; Table 2)。

植え継ぎ培養の pH 値はワムシ接種 1 時間後には 7.1 であり、接種 24 時間後には 7.4 にまで上昇したが、その後変化しなかった(Table 3)。植え継ぎ培養の溶存酸素濃度はワムシ接種 1 時間後には 7.12mg /L であつ

Table 1. Statistics of rotifer populations of eight replicates of batch culture. The number included in parenthesis indicates standard deviation

Passing time after inoculation	Average of density (ind. /mL)	Minimum density (ind. / mL)	Maximum density (ind. / mL)	Average of increasing rate from the previous day (%)
1 hour	676.0 (88.8)	582	852	-
24 hour	1,065.8 (183.8)	808	1,368	61.3 (42.3)
48 hour	1,203.8 (243.5)	928	1,662	13.0 (11.6)

Table 2. Statistics of rotifer populations in the cultivate and harvest tanks of continuous culture for 27 days.

Type of tank	Average of density (ind. /mL)	Standard deviation	Minimum density (ind. /mL)	Maximum density (ind. /mL)	Coefficient of variation (%)
Cultivation	864.7	203.8	516	1296	23.6
Harvest	749.9	186.3	506	1332	24.8

たものから、接種 48 時間後には 2.62mg/L まで減少した。その一方、遊離アンモニア濃度は上昇し続けていた (Table 3)。

一方、連続培養の pH 値と溶存酸素濃度には培養槽と収穫槽の間に違いがなかった (Table 3)。植え継ぎ培養の pH と比較すると、連続培養の pH 値は植え継ぎ培養法のワムシ接種 24 時間及び 48 時間後の値よりも高い傾向が認められた (Table 3; Mann-Whitney の U 検定,  $p < 0.05$ )。培養槽の遊離アンモニア濃度は収穫槽より高かった (Table 3; Mann-Whitney の U 検定,  $p < 0.05$ )。また、植え継ぎ培養法のワムシ接種 1 時間及び 24 時間後の遊離アンモニア濃度よりも連続培養法の両水槽の濃度の方が高かった (Table 3; Mann-Whitney の U 検定,  $p < 0.05$ )。

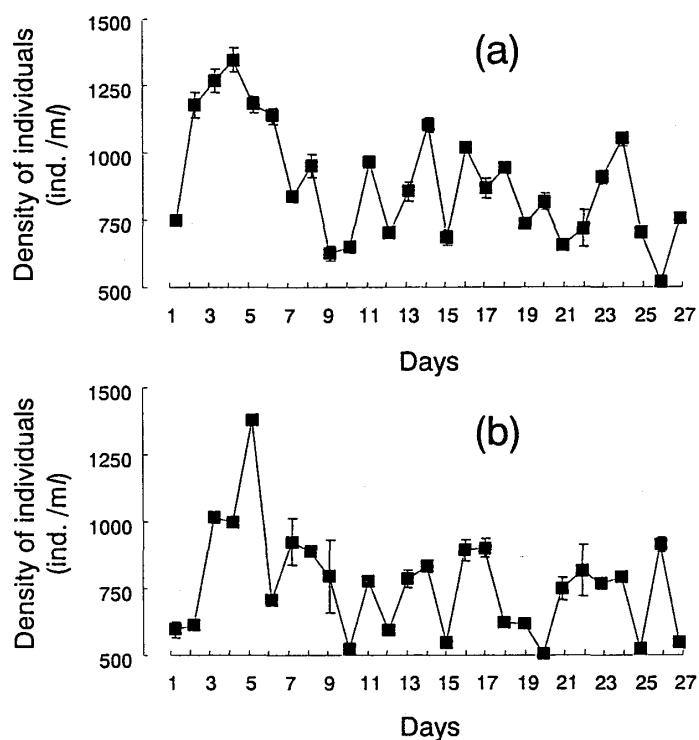


Fig. 3. Daily change of population density of rotifer in cultivate and harvest tanks of continuous culture for 27 days. Graph (a) indicates the result in the cultivate tank and graph (b) does that in the harvest one.

Table 3. pH, dissolved oxygen and ammoniac nitrogen in the culture water of batch and continuous culture. Each number indicates the average during culture period and each number included in parenthesis indicates standard deviation. Each alphabetical superscript indicates the result of Mann-Whitney's U test among primary cultures ( $p < 0.05$ ,  $a > b > c > d > e$ ).

Primary culture		pH	Dissolved oxygen (mg/L)	NH <sub>3</sub> -N (mg/L)
Batch culture (after inoculation)	1hr	7.163 <sup>c</sup> (0.045)	7.120 <sup>a</sup> (1.01)	0.010 <sup>e</sup> (0.010)
	24hr	7.403 <sup>b</sup> (0.078)	3.803 <sup>ab</sup> (3.195)	0.197 <sup>d</sup> (0.032)
	48hr	7.667 <sup>b</sup> (0.250)	2.623 <sup>b</sup> (2.197)	0.420 <sup>b</sup> (0.050)
Continuous culture	Cultivation tank	8.150 <sup>a</sup> (0.026)	7.230 <sup>a</sup> (0.777)	0.627 <sup>a</sup> (0.076)
	Harvest tank	8.170 <sup>a</sup> (0.044)	7.350 <sup>a</sup> (1.032)	0.300 <sup>c</sup> (0.035)

海産ツボワムシ類 *Brachionus* の分類とその手法

脂肪酸組成

1次培養直後の試料の脂質総量と4脂肪酸量(16:0, 16:2, 16:3及び18:2 n-6)、n-6高度不飽和脂肪酸 (highly unsaturated fatty acid, 以下HUFA) 総量は1次培養条件の間では異なった (Table 4)。しかし、栄養強化を行った後は栄養強化法に関わらず1次培養条件間で脂質総量に違いはなかった (Table 5及び6)。また、1次培養直後の試料で1次培養条件の間で有意差のあった脂肪酸の数は栄養強化を行った場合の方が多かった (*N. oculata* 強化: 9脂肪酸, n-3及びn-6 HUFA 総量, Table 5; 市販強化剤強化: 7脂肪酸, n-3及びn-6 HUFA 総量, Table 6; Kruskal-Wallis 検定,  $p < 0.05$ )。1次培養条件間で有意差があった脂肪酸では、連続培養収穫槽からの試料の値が最も高い値を示した (Table 4~6; U検定,  $p < 0.05$ )。また、連続培養収穫槽からの試料の値は、植え

Table 4. Fatty acid contents of the rotifer just after primary cultures. Each value indicates the average of three replicates and each one in parenthesis does standard deviation. Each alphabetical superscript indicates the result of Mann-Whitney's U test among primary cultures ( $p < 0.05$ ,  $a > b > c$ ).

	Batch culture (after inoculation)			Continuous culture	
	1 hr	24 hr	48 hr	cultivation tank	harvest tank
Total lipid contents (mg /100mg DW)	13.36 <sup>c</sup> (1.03)	16.06 <sup>ab</sup> (1.52)	14.12 <sup>bc</sup> (0.44)	16.60 <sup>a</sup> (1.38)	17.06 <sup>a</sup> (0.35)
Fatty acids contents (mg /g DW)					
14:0	0.99 (0.30)	1.52 (0.86)	0.94 (0.20)	1.25 (0.24)	1.00 (0.13)
16:0	6.94 <sup>b</sup> (1.74)	11.79 <sup>a</sup> (1.15)	6.68 <sup>b</sup> (1.06)	13.14 <sup>a</sup> (0.57)	12.91 <sup>a</sup> (1.10)
16:1	0.68 (0.22)	0.94 (0.32)	0.67 (0.21)	0.99 (0.18)	0.83 (0.22)
16:2	3.68 <sup>b</sup> (0.74)	7.49 <sup>a</sup> (2.18)	3.88 <sup>b</sup> (0.81)	5.91 <sup>a</sup> (0.36)	5.93 <sup>a</sup> (0.56)
16:3	0.71 <sup>b</sup> (0.08)	0.49 <sup>bc</sup> (0.38)	0.61 <sup>c</sup> (0.02)	1.12 <sup>a</sup> (0.08)	1.15 <sup>a</sup> (0.04)
18:0	1.65 (0.34)	2.01 (0.99)	1.49 (0.29)	2.82 (0.08)	2.75 (0.19)
18:1 n-9	0.63 (0.56)	1.01 (0.53)	0.48 (0.09)	0.81 (0.08)	0.85 (0.13)
18:1 n-7	0.58 (0.05)	0.53 (0.47)	0.57 (0.04)	0.99 (0.07)	0.66 (0.57)
18:2 n-6	14.80 <sup>b</sup> (2.69)	24.31 <sup>a</sup> (3.99)	14.09 <sup>b</sup> (1.37)	26.14 <sup>a</sup> (1.95)	26.43 <sup>a</sup> (1.70)
18:3 n-3	2.14 (1.17)	3.49 (1.47)	1.46 (0.04)	3.86 (2.51)	5.31 (0.29)
20:4 n-6	0.06 (0.10)	0.31 (0.36)	0.30 (0.26)	0.21 (0.19)	0.23 (0.21)
20:4 n-3	0.16 (0.28)	0.33 (0.32)	0.02 (0.04)	0.31 (0.27)	0.09 (0.16)
20:5 n-3	0.00 (0.00)	0.02 (0.03)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)
22:5 n-6	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)
22:5 n-3	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)
22:6 n-3	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	0.01 (0.01)	0.04 (0.07)	0.39 (0.36)
Σ n-3HUFA	2.30 (1.44)	3.84 (1.81)	1.48 (0.02)	4.21 (2.23)	5.79 (0.59)
Σ n-6HUFA	14.86 <sup>b</sup> (2.73)	24.62 <sup>a</sup> (4.17)	14.39 <sup>b</sup> (1.42)	26.34 <sup>a</sup> (1.96)	26.66 <sup>a</sup> (1.68)

継ぎ培養ワムシ接種 48 時間後の試料の値より 2 倍近く高かった (Table 4~6)。

栄養強化後の試料から抽出した炭素数が 20 以上の脂肪酸のうち、1 次培養条件間で有意差が検出されたものはアラキドン酸 (20:4 n-6, ARA) 及びエイコサペンタエン酸 (EPA, 20:5 n-3)、ドコサヘキサエン酸 (DHA, 22:6 n-3) であった。しかし、その傾向は栄養強化方法で異なった (Table 5 及び 6)。N. oculata で栄養強化した場合は、連続培養から採取した試料の ARA 及び EPA 量の方が植え継ぎ培養から採取した試料のものよりも多かった (Table 5; Kruskal-Wallis 検定及び U 検定,  $p < 0.05$ )。一方、市販強化剤で栄養強化した場合、植え継ぎ培養からのワムシ接種 24 時間後の試料及び連続培養収穫槽からの試料の ARA 及び EPA, DHA 量は他の

Table 5. Fatty acid contents of the rotifer enriched with *Nannochloropsis oculata* after primary cultures. Each value indicates the average of three replicates and each one in parenthesis does standard deviation. Each alphabetical superscript indicates the result of Mann-Whitney's U test among primary cultures ( $p < 0.05$ ,  $a > b > c$ ).

	Batch culture (after inoculation)			Continuous culture	
	1 hr	24 hr	48 hr	cultivation tank	harvest tank
Total lipid contents (mg /100mg DW)	13.41 (1.46)	14.25 (0.47)	13.74 (1.43)	15.35 (1.60)	15.87 (1.22)
Fatty acids contents (mg /g DW)					
14:0	1.17 <sup>b</sup> (0.32)	1.24 <sup>b</sup> (0.16)	1.16 <sup>b</sup> (0.10)	1.96 <sup>a</sup> (0.14)	2.34 <sup>a</sup> (0.84)
16:0	6.87 <sup>b</sup> (0.44)	5.94 <sup>c</sup> (0.25)	5.83 <sup>bc</sup> (0.91)	9.88 <sup>a</sup> (1.66)	10.37 <sup>a</sup> (2.38)
16:1	2.62 <sup>d</sup> (0.19)	3.54 <sup>b</sup> (0.06)	3.25 <sup>c</sup> (0.24)	5.81 <sup>a</sup> (0.49)	6.21 <sup>a</sup> (1.35)
16:2	1.88 <sup>bc</sup> (0.25)	1.81 <sup>c</sup> (0.06)	1.37 <sup>d</sup> (0.38)	2.70 <sup>ab</sup> (0.59)	3.40 <sup>a</sup> (0.78)
16:3	0.98 (0.13)	0.10 (0.09)	0.33 (0.57)	0.65 (0.45)	0.33 (0.17)
18:0	1.77 (0.22)	0.74 (0.11)	1.12 (0.45)	1.92 (0.55)	1.60 (0.14)
18:1 n-9	1.11 <sup>b</sup> (0.34)	1.02 <sup>b</sup> (0.08)	1.01 <sup>b</sup> (0.03)	1.67 <sup>a</sup> (0.07)	1.76 <sup>a</sup> (0.22)
18:1 n-7	1.02 (0.05)	0.85 (0.06)	1.08 (0.51)	1.58 (0.39)	1.54 (0.13)
18:2 n-6	10.08 <sup>a</sup> (1.49)	6.66 <sup>b</sup> (0.19)	6.47 <sup>b</sup> (0.94)	10.79 <sup>a</sup> (1.33)	11.16 <sup>a</sup> (1.83)
18:3 n-3	1.22 <sup>a</sup> (0.39)	0.77 <sup>b</sup> (0.07)	0.60 <sup>c</sup> (0.05)	1.30 <sup>a</sup> (0.17)	1.39 <sup>a</sup> (0.17)
20:4 n-6	1.29 <sup>b</sup> (0.18)	1.01 <sup>b</sup> (0.14)	1.19 <sup>ab</sup> (0.36)	1.91 <sup>a</sup> (0.42)	1.81 <sup>a</sup> (0.24)
20:4 n-3	0.32 (0.15)	0.00 (0.00)	0.08 (0.14)	0.18 (0.19)	0.05 (0.08)
20:5 n-3	2.91 <sup>d</sup> (0.22)	5.38 <sup>b</sup> (0.48)	4.62 <sup>c</sup> (0.21)	8.03 <sup>a</sup> (0.57)	9.21 <sup>a</sup> (1.20)
22:5 n-6	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	0.04 (0.07)	0.18 (0.32)
22:5 n-3	0.01 (0.02)	0.00 (0.00)	0.06 (0.10)	0.07 (0.11)	0.00 (0.00)
22:6 n-3	0.29 (0.27)	0.00 (0.00)	0.05 (0.09)	0.22 (0.18)	0.26 (0.22)
Sn-3HUFA	4.76 <sup>d</sup> (0.67)	6.15 <sup>b</sup> (0.54)	5.41 <sup>c</sup> (0.10)	9.80 <sup>a</sup> (0.41)	10.89 <sup>a</sup> (1.34)
Sn-6HUFA	11.37 <sup>a</sup> (1.66)	7.67 <sup>b</sup> (0.32)	7.66 <sup>b</sup> (1.30)	12.74 <sup>a</sup> (1.73)	13.16 <sup>a</sup> (2.07)



海産ツボワムシ類 *Brachionus* の分類とその手法

1次培養条件のものよりも多かった (Table 6; Kruskal-Wallis 検定及び U 検定,  $p < 0.05$ )。

植え継ぎ培養で栄養強化を行っていない試料では、ワムシ接種 24 時間後の脂肪酸量が他の 2 つの植え継ぎ培養法の試料のものよりも多い傾向にあった (Table 4; U 検定,  $p < 0.05$ )。同様の傾向が市販栄養強化剤で栄養強化した場合にも認められた (Table 6; U 検定,  $p < 0.05$ )。さらに、ワムシ接種 24 時間後のそれらの脂肪酸の量は連続培養収穫槽からの試料のものと同程度であった (Table 4 及び 6)。このような傾向は *N. oculata* で栄養強化した場合には認められなかった。また、*N. oculata* で栄養強化した場合には連続培養からの試料の量の脂肪酸量は植え継ぎ培養法からの試料のそれよりも連続培養法多かった (Table 5; U 検定,  $p < 0.05$ )。一方、連

Table 6 Fatty acid contents of the rotifer enriched with nutritional enrichment diet after primary cultures. Each value indicates the average of three replicates and each one in parenthesis does standard deviation. Each alphabetical superscript indicates the result of Mann-Whitney's U test among primary cultures ( $p < 0.05$ ,  $a > b > c$ ).

	Batch culture (after inoculation)			Continuous culture	
	1 hr	24 hr	48 hr	cultivation tank	harvest tank
Total lipid contents (mg/100mg DW)	17.30 (2.40)	21.24 (3.03)	18.86 (1.61)	19.43 (1.27)	20.44 (1.30)
Fatty acids contents (mg/g DW)					
14:0	1.22 <sup>b</sup> (0.20)	1.86 <sup>a</sup> (0.27)	1.23 <sup>b</sup> (0.18)	1.65 <sup>a</sup> (0.11)	2.01 <sup>a</sup> (0.41)
16:0	15.72 (7.01)	17.67 (2.33)	11.18 (1.67)	13.73 (1.69)	17.94 (3.34)
16:1	2.96 (1.46)	4.14 (0.24)	2.46 (0.41)	3.15 (0.19)	3.84 (0.62)
16:2	2.04 (0.91)	2.34 (0.31)	1.44 (0.23)	1.81 (0.35)	2.40 (0.48)
16:3	0.44 <sup>c</sup> (0.00)	0.94 <sup>a</sup> (0.15)	0.61 <sup>b</sup> (0.13)	0.70 <sup>b</sup> (0.13)	1.15 <sup>ab</sup> (0.49)
18:0	3.85 (1.19)	5.43 (0.72)	2.63 (0.44)	3.48 (0.84)	4.28 (0.82)
18:1 n-9	6.77 <sup>bc</sup> (1.73)	10.33 <sup>a</sup> (0.66)	5.30 <sup>c</sup> (0.78)	7.71 <sup>b</sup> (0.68)	8.20 <sup>ab</sup> (1.47)
18:1 n-7	0.68 (1.18)	0.89 (1.31)	1.22 (0.22)	0.52 (0.91)	1.87 (0.34)
18:2 n-6	10.85 <sup>c</sup> (2.14)	18.22 <sup>a</sup> (1.56)	10.75 <sup>c</sup> (1.53)	13.75 <sup>bc</sup> (1.45)	17.23 <sup>ab</sup> (3.15)
18:3 n-3	1.10 (0.59)	1.47 (0.06)	0.78 (0.12)	1.08 (0.18)	1.28 (0.18)
20:4 n-6	0.84 <sup>c</sup> (0.19)	1.45 <sup>a</sup> (0.11)	0.79 <sup>c</sup> (0.23)	1.13 <sup>bc</sup> (0.19)	1.33 <sup>ab</sup> (0.19)
20:4 n-3	0.18 (0.18)	0.52 (0.04)	0.59 (0.32)	0.50 (0.28)	0.98 (0.49)
20:5 n-3	2.73 <sup>c</sup> (0.48)	4.46 <sup>a</sup> (0.18)	2.49 <sup>c</sup> (0.41)	3.38 <sup>b</sup> (0.34)	4.00 <sup>ab</sup> (0.72)
22:5 n-6	0.69 (0.27)	1.06 (0.09)	0.55 (0.24)	0.85 (0.11)	0.90 (0.17)
22:5 n-3	0.22 (0.20)	0.33 (0.06)	0.24 (0.05)	0.29 (0.06)	0.39 (0.13)
22:6 n-3	4.66 <sup>c</sup> (0.57)	8.52 <sup>a</sup> (0.44)	4.50 <sup>c</sup> (0.91)	6.31 <sup>b</sup> (0.64)	7.31 <sup>ab</sup> (1.15)
Sn-3HUFA	8.90 <sup>c</sup> (1.64)	15.30 <sup>a</sup> (0.74)	8.60 <sup>c</sup> (1.71)	11.55 <sup>bc</sup> (1.11)	13.97 <sup>ab</sup> (2.12)
Sn-6HUFA	12.37 <sup>c</sup> (2.55)	20.74 <sup>a</sup> (1.64)	12.09 <sup>c</sup> (1.85)	15.73 <sup>bc</sup> (1.74)	19.47 <sup>ab</sup> (3.40)

続培養法の脂肪酸量には両水槽からの試料に違いがなかった (Table 4~6)。

### 考察

一般に、ワムシの植え継ぎ培養法は3~5日間で行われる。その間、ワムシ個体群の増殖フェーズは導入期から対数増殖期、最終的に定常期へと移っていく。こうしたワムシ個体群の増殖フェーズの違いはワムシの生理的活性に影響する。<sup>20)</sup> 本研究では、植え継ぎ培養法の後半よりも前半の方の日間増加率が高くなった (Table 1)。したがって、本試験で用いた植え継ぎ培養法では、植え継いだ次の日、特に植え継いで24時間後のワムシ個体群の状態は対数増殖期に相当すると判断できる。また、栄養強化する前の植え継ぎ24時間後のワムシ個体群の脂肪酸含量は植え継ぎ1及び48時間後の個体群より多い傾向にあった (Table 4)。同じ傾向が植え継ぎ法で培養した後市販栄養強化剤で栄養強化した場合にも認められたことから (Table 6)、植え継ぎ培養法における対数増殖期のワムシの生理活性が上昇し、このことによってワムシがより多くの脂肪酸を吸収したものと推測できる。連続法で培養した直後のワムシ個体群の脂肪酸含量も同様に高い傾向にあり (Table 4)、それ故、連続法で培養されたワムシもまた生理活性が高いと判断できる。*N. oculata* で栄養強化した場合にも多くの脂肪酸で同様の傾向が見られた (Table 5)。しかし、2つの脂肪酸 (18:2 n-6 及び 18:3 n-3) については、植え継ぎ24及び48時間後のワムシより植え継ぎ1時間後のワムシの含有量が高くなった (Table 5)。一方で、植え継ぎ24時間後の18:3 n-3の含有量は48時間後のものよりも高い (Table 5)。したがって、総合的な見地から、1次培養で生理活性の高いワムシがより多くの脂肪酸を吸収すると結論づけられる。

過去の研究により、いくつかのケモスタット式連続培養が開発されてきた<sup>4, 5, 21, 22)</sup>。引き続き、粗放的な連続培養が改良され、10m<sup>3</sup>以上の水槽でも連続培養法が行われるようになってきた。<sup>18, 23)</sup> 本研究で用いた連続培養法は桑田<sup>18)</sup>の方法を改変したものであるが、本結果の個体数密度 (500~1,000 個体 /mL) は桑田<sup>18)</sup>が報告した *B. plicatilis* を使用した密度 (100~400 個体 /mL) よりも高いものであった (Fig. 2)。しかも、本稿では27日間の培養結果について報告しているが、同じ培養を現在もまだ保有している (2007年6月現在)。本研究の連続培養における培養・収穫両水槽の水質は極めて安定したものであったが (Table 3)、遊離アンモニア濃度や pH 値は植え継ぎ培養のものより高かった (Table 3)。植え継ぎ培養法の場合、遊離アンモニア濃度の上昇や溶存酸素濃度の低下に伴い、ワムシの生理活性は低下する。<sup>17, 24-27)</sup> 同様の傾向が本研究の植え継ぎ培養法でも観察できた (Table 3)。植え継ぎ式で培養したワムシの栄養強化後の脂肪酸含有量でも、多くの場合、植え継ぎ48時間後の含有量は24時間後のものより少なかった (Table 5 及び 6)。連続培養法の両水槽では、溶存酸素濃度は高いレベルを維持していたが (Table 3)、培養槽のアンモニア態窒素濃度は全一次培養条件の中では最も高かった (Table 3)。収穫槽のアンモニア態窒素濃度は培養槽や植え継ぎ法の植え継ぎ48時間後のものより低く、植え継ぎ法の植え継ぎ1及び24時間後のものよりも高かった (Table 3)。一方、培養槽からのワムシを市販強化剤によって栄養強化した後の脂肪酸含有量は高いレベルにある (Table 6)。以上の諸点を考慮すると、培養水中のアンモニア態窒素の濃度はワムシの生理活性に対して、溶存酸素濃度よりも強く影響を及ぼすものと考えられる。しかし、これとはことなる傾向が *N. oculata* で栄養強化した場合に見られる。すなわち、一次培養では連続培養のアンモニア態窒素濃度の方が高いレベルであったのにも関わ

らず、脂肪酸含有量はいずれの植え継ぎ培養法よりも高かった (Table 3 及び 5)。これは、*N. oculata* による栄養強化時間が市販栄養強化剤の栄養強化時間よりも 3 倍長いことが影響していると思われる。つまり、栄養強化時間が長ければアンモニア態窒素による悪影響は薄れるが、むしろ低酸素濃度による影響の方が強く表れ、その結果として総体的に植え継ぎ培養のワムシの脂肪酸含有量が少なくなったものと考えられる。

本研究では、連続法で培養されたワムシ個体群の状態が、植え継ぎ培養法のどの増殖フェーズに相当するかは明らかに出来なかった。連続培養法では培養水の添加とワムシ個体群密度が一定であるならば、ワムシ個体群増殖率もまた一定になるはずである。今回の連続培養法では個体群密度が一定しなかったが、培養の崩壊や逆の極端な増殖も見られなかった (Fig. 2)。培養水と淡水クロレラの添加量が 1 日 300L (60% /日) であったので、ケモスタット式培養の原理から個体群増殖率も 60% /日であるはずである。連続法で培養されたワムシの多くの脂肪酸含有量が植え継ぎ培養法の植え継ぎ 24 時間後のものと同レベルであった (Table 4 ~6)。したがって、増殖率と生理活性の面から考えると、連続培養のワムシ個体群の増殖フェーズは対数増殖期に相当すると思われる。しかし、水質の面から考えると植え継ぎ 24 時間後の水質と連続培養法の水質とは全く異なっている (Table 3)。それゆえ、連続培養のワムシ個体群の増殖フェーズが対数増殖期であるかどうかについては結論できない。連続培養法におけるワムシの個体群増殖の状態を明らかにするためには、被甲長頻度分布やワムシの活性について明らかにする必要がある。現在、我々は被甲長頻度分布や個体群増殖フェーズ、栄養強化の効果の間の関係について研究を進めており、近日中に報告する予定である。

多くの海産魚介類種苗生産場ではワムシを植え継ぎ式で培養しており、3~5 水槽を使いながら培養期間の最終日にワムシを収穫して仔魚に給餌している。本研究の植え継ぎ培養法では、植え継ぎ 48 時間後がこの給餌するための収穫時期に相当する。連続培養法の場合、収穫槽のワムシが仔魚への給餌に使われる。本研究結果では、連続培養収穫槽からのワムシの栄養強化後の脂肪酸含有量は、植え継ぎ培養法の植え継ぎ 48 時間後のものの 1.5~2 倍であった (Table 5 及び 6)。仔魚に対する餌料価値については、n-3HUFA 含有量、特にエイコサペンタエン酸 (20:5 n-3, EPA) 及びドコサヘキサエン酸 (20:5 n-3, EPA)、n-3HUFA 総量、DHA/EPA 比が重要であることが明らかにされている。<sup>8,28-31)</sup> EPA あるいは DHA、n-3HUFA 総量は仔魚の成長、形態形成、および生残に対して様々に影響を及ぼす。<sup>28-32)</sup> 栄養強化に関するこれまでの研究では植え継ぎ式で培養したワムシを使用していた。つまり、栄養強化剤は植え継ぎ式で培養されたワムシのみを考慮に入れて設計された可能性が高い。連続法で培養したワムシを栄養強化する際には、植え継ぎ法で培養したワムシよりも多く脂肪酸を取り込ませることが可能であり、したがって、脂肪酸量の不足に関係する栄養上の問題を解決できるようになる。一方で、仔魚の脂肪酸の過剰摂取による悪影響が現れることも否定できない。<sup>31,32)</sup> また、本研究では脂肪酸のみについて検討したが、他の栄養素、例えばタンパク質やビタミン類についても過剰摂取による悪影響の可能性がある。魚類仔魚がワムシを介して過剰にビタミン A を摂取した場合、形態異常が発生することが知られている。<sup>33,34)</sup> 連続培養法の導入は、経費や労力の軽減に繋がるが、一方である種の栄養素の過剰摂取による悪影響を避けるため、脂肪酸以外の栄養素について連続培養法の効果を検討する課題が残っている。その結果如何では、栄養強化剤の構成を改良する必要もが生ずる可能性がある。

謝辞

連続培養法の実施に際し、培養方法の助言並びにワムシ株の提供をしていただいた桑田博氏（独）水産総合研究センター業務企画部）に感謝申し上げます。また、市販栄養強化剤を提供していただいたナガセ生化学販売株式会社佐藤信光氏にお礼申し上げます。

文献

- 1) 伊藤隆, 輪虫の海水培養と保存について. *三重県立大水産学部紀要*, **3**, 708-740 (1960)
- 2) 北島力・藤田矢郎・大和史人・米康夫・渡辺武, クロレラで二次培養したパン酵母ワムシの餌料効果. *日本水産学会誌*, **45**, 469-471 (1979)
- 3) Lubzens, E., Raising rotifers for use in aquaculture. *Hydrobiologia*, **147**, 245-255 (1987)
- 4) James, C. M., and Abu-Rezeq, T., An intensive chemostat culture system for the production of rotifers for aquaculture. *Aquaculture*, **81**, 291-301 (1989)
- 5) James, C. M., and Abu-Rezeq, T., Intensive rotifer cultures using chemostats. *Hydrobiologia*, **186/187**, 423-430 (1989)
- 6) Yoshimura, K., Usuki, K., Yoshimatsu, T., Kitajima, C., and Hagiwara, A., Recent development of a high density mass culture system for the rotifer *Brachionus rotundiformis* Tschugunoff. *Hydrobiologia*, **358**, 139-144 (1997)
- 7) Lubzens, E., Zmora, O., and Barr, Y., Biotechnology and aquaculture of rotifers. *Hydrobiologia*, **446/447**, 337-353 (2001)
- 8) 渡辺武・北島力・荒川敏久・福所邦彦・藤田矢郎, 脂肪酸組成からみたシオミズツボワムシの栄養価. *日本水産学会誌*, **44**, 1109-1114 (1978)
- 9) 三木教立・谷口朝宏・浜川秀夫・山田幸男・桜井則広, ビタミン A 投与ワムシ給餌によるヒラメ白化防除. *水産増殖*, **38**, 147-155 (1990)
- 10) Takeuchi, T., Dedi, J., Haga, Y., Seikai, T., and Watanabe, T. Effect of vitamin A compounds on bone deformity in larval Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Aquaculture*, **169**, 155-165 (1998)
- 11) Hirayama, K. A consideration why mass culture of the rotifer *Brachionus plicatilis* with baker's yeast is unstable. *Hydrobiologia*, **147**, 269-270 (1987)
- 12) 今田克・影山百合明・渡辺武・北島力・藤田矢郎・米康夫, 魚介類種苗生産用酵母（油脂酵母）の開発. *日本水産学会誌*, **45**, 955-959 (1979)
- 13) Watanabe, T., Tamiya, A., Oka, A., Hirata, M. and Kitajima, C., and Fujita, S. Improvement of dietary value of live foods for fish larvae by feeding them on  $\omega$ 3 highly unsaturated fatty acids and fat-soluble vitamins. *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.*, **49**, 471-479 (1983)
- 14) Watanabe, T. Importance of docosahexaenoic acid in marine larval fish. *J. World Aquacult. Soc.*, **24**, 152-161 (1993)
- 15) 友田努・小磯雅彦・桑田博・陳昭能・竹内俊郎. 増殖ステージが異なるシオミズツボワムシのマダイ仔

海産ツボワムシ類 *Brachionus* の分類とその手法

- 魚に対する餌料価値. *日本水産学会誌*, **70**, 573-582 (2004)
- 16) 友田努・小磯雅彦・桑田博・陳昭能・竹内俊郎. 増殖ステージが異なるシオミズツボワムシのヒラメ仔魚に対する餌料価値. *日本水産学会誌*, **71**, 555-562 (2005)
- 17) 小磯雅彦・日野明德. シオミズツボワムシの大量培養における増殖停滞の機構に関する研究. *水産増殖*, **50**, 197-204 (2002)
- 18) 桑田博. 粗放連続培養. *In: 海産ワムシ類の培養ガイドブック*, 日本栽培漁業協会編, 日本栽培漁業協会, 東京, 92-107 (2000)
- 19) Folch, J., Lees, M., and Sloane-Stanley, G. H. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.*, **226**, 497-509 (1957)
- 20) 小磯雅彦・日野明德. ワムシの活力判定と個体群の増殖予測に関する研究. *水産増殖*, **47**, 249-256 (1999)
- 21) Fu, Y., Hada, A., Yamashita, T., Yoshida, Y., and Hino, A. Development of a continuous culture system for stable mass production of the marine rotifer *Brachionus*. *Hydrobiologia*, **358**, 145-151 (1997)
- 22) 山下貴志. 2000. 装置連続培養. *In: 海産ワムシ類の培養ガイドブック*, 日本栽培漁業協会編, 日本栽培漁業協会, 東京, 81-92 (2000)
- 23) 桑田博・日野明德. ワムシ培養のバージョンアップ. *さいばい*, **98**, 24-27 (2001)
- 24) Yu, J. P., and Hirayama, K. The effect of un-ionized ammonia on the population growth of the rotifer in mass culture. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **52**, 1509-1513 (1986)
- 25) 吉村研治・北島力・宮本義次・岸本源次. 濃縮淡水クロレラ給餌によるシオミズツボワムシの高密度培養における増殖阻害要因について. *日本水産学会誌*, **60**, 207-213 (1994)
- 26) de Araujo, A. B., Hagiwara, A., and Snell, T. W. Effect of unionized ammonia, viscosity and protozoan contamination on reproduction and enzyme activity of the rotifer *Brachionus rotundiformis*. *Hydrobiologia*, **446/447**, 363-368 (2001)
- 27) Yamasaki, S., Secor, D. H., and Hirata, H. Population growth of two types of rotifer (L and S) *Brachionus plicatilis* at different dissolved oxygen levels. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **53**, 1303 (1987)
- 28) Watanabe, T., Izquierdo, M. S., Takeuchi, T., Satoh, S., and Kitajima, C. Comparison between eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids in terms of essential fatty acid efficacy in larval red seabream. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **55**, 1635-1640 (1989)
- 29) Izquierdo, M. S., Watanabe, T., Takeuchi, T., Arakawa, T., and Kitajima, C. Requirement of larval red seabream *Pagrus major* for essential fatty acid. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **55**, 859-867 (1989)
- 30) Furuita, H., Konishi, K., and Takeuchi, T. Effect of different levels of eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid in *Artemia nauplii* on growth, survival and salinity tolerance of larvae of the Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. *Aquaculture*, **170**, 59-69 (1999)
- 31) Suprayudi, M. A., Takeuchi, T., and Hamasaki, K. Effect of *Artemia* enriched with eicosapentaenoic and docosahexaenoic acid on survival and occurrence of mud crab *Scylla serrata*. *Fisheries Science*, **70**, 650-658

(2004)

- 32) 竹内俊郎・鄭鋒・與世田兼三・廣川潤・渡邊武. DHA 強化ワムシのマダラ仔魚に対する栄養価. *日本水産学会誌*, **60**, 641-652 (1994)
- 33) 竹内俊郎・石崎靖朗・渡邊武・今泉圭之輔・清水健. DHA 含量が異なるワムシを摂餌したブリ仔稚魚のアルテミア摂餌期における DHA 要求. *日本水産学会誌*, **64**, 270-275 (1998)
- 34) Haga, Y., Takeuchi, T., and Seikai, T. Influence of all-*trans* retinoic acid on pigmentation and skeletal formation in larval Japanese flounder. *Fisheries Science*, **68**, 560-570 (2002)

\*\*\*\*\*

Annu. Rep. Fac. Life Sci. Biotechnol., Fukuyama Univ. (6), 35-49 (2007)

**Effect of primary cultivation method and population growth phase on nutritional enrichment of euryhaline rotifer *Brachionus plicatilis***

Tomonari Kotani<sup>a\*</sup>, Teruhisa Genka<sup>a</sup>, Hiroshi Fushimi<sup>a</sup>, Masahiro Hayashi<sup>b</sup>

<sup>a</sup>Department of Marine Biotechnology, Faculty of Life Science and Biotechnology,  
Fukuyama University, Fukuyama, Hiroshima 729-0292, Japan

<sup>2</sup> Department of Biological Production and Environmental Science, Faculty of Agriculture, University of Miyazaki,  
Gakuen-kibanadai-nishi-1-1, Miyazaki 889-2192, Japan

It is important to evaluate the effect of the primary cultivation method of rotifers on the secondary cultivation as nutritional enrichment. So far, various methods of rotifer cultivation have been developed. Recently, mainly two methods are performed, batch or continuous culture. This study aimed to clarify the fatty acid contents after the nutritional enrichment in order to evaluate the quality of rotifers cultured with different methods. Two primary rotifer cultures were performed using batch or continuous methods. From the batch culture, three experimental populations were used; they were taken from the culture one, 24 and 48 hour after inoculation of the rotifers. The continuous culture was performed with two tanks; one was for cultivation with continuous feeding and water supply (cultivation tank), and another was for stocking from cultivation tank by over flow (harvest tank). From the continuous culture, two experimental populations were used from the cultivation and harvest tanks. Secondary cultures were performed after each primary culture and each rotifer population was nutritionally enriched with *Nannochloropsis oculata* and a commercial nutritional enrichment diet. After secondary culture, the fatty acid contents of each population were analyzed using gas chromatography. Although there was no significant difference of lipid quantity among primary rotifer cultures, in both cases of secondary culture, total n-3 HUFA quantity from both continuous culture populations

## 海産ツボワムシ類 *Brachionus* の分類とその手法

was higher than that from batch culture population one and 48 hour after inoculation. When the enrichment was performed with *N. oculata*, rotifer populations from the two tanks of continuous culture and the batch culture tank 24 hour after inoculation contained a higher quantity of ARA and EPA than those from the two other samples taken from the batch culture. When the enrichment was performed with enrichment diet, populations from the two tanks of continuous culture and the sample taken 24 hour after inoculation from the batch culture tank contained higher quantities of ARA, EPA and DHA than those from the two other samples taken from the batch culture.

**Key words: rotifer, batch culture, continuous culture, nutritional enrichment, fatty acid**