

短 報

小型容器を用いた市販クロレラ給餌による 淡水種輪虫ツボワムシの耐久卵生産とその利用

新関晃司*1・佐藤太津真*2・泉 茂彦*2

Resting egg production of the freshwater rotifer *Brachionus calyciflorus* using a small-scale culture equipment

Kouji NIIZEKI, Tatsuma SATO and Shigehiko IZUMI

A method for producing the resting eggs of freshwater rotifers was investigated using freshwater rotifers hatched from resting eggs as the parent generation for culture. The resting eggs preserved in a refrigerator for 16 months were hatched in one day in groundwater at 25°C (hatching rate 12.3%). Sub culture of these freshwater rotifers at transfer intervals of four and seven days induced higher incidence of bisexual reproduction in the four-day transfer interval group than in the seven-day transfer interval group. Culture of freshwater rotifers with a four-day transfer interval or without transfers for 32 days led to average population densities of 462 rotifers/mL and 260 rotifers/mL in the transfer group and non-transfer group, respectively; the transfer group exhibited a significantly higher population density. In the transfer group, population density was maintained at over 100 rotifers/mL for 32 days. These results suggest that using our simple method, it may be possible to culture freshwater rotifers using rotifers hatched from resting eggs as the parent generation for culture.

キーワード：ツボワムシ, 耐久卵, 人工培養, 市販クロレラ
2016年2月24日受付 2018年9月4日受理

淡水産ワムシ類は、淡水魚類の初期餌料として有効である (Sato 1950, 鈴木1971) が、なかでも日本全国の湖沼に分布するツボワムシ *Brachionus calyciflorus* は、ワムシ耐久卵が堆積している池に肥料を投入する施肥法 (千葉ら1970) によって培養され、古くから餌料に利用されてきた。しかしながら、施肥法は培養密度が不安定で (中本ら2007)、さらに、動物プランクトン相をコントロールすることが困難であり (新関ら2014)、生産者の意図したとおりに培養できないことが多い。このような課題を解決するためには、ツボワムシを集約的に安定培養する手法と、元種としての耐久卵を採取・保管する技術の開発が必要である。

管理下でのツボワムシの培養に関して、田中 (1983) は20L水槽を用い、油脂酵母と自ら培養したクロレラ給餌による培養試験を実施し、9日間の培養で最高密度569個体/mLまで増殖したことを報告した。さらに近年、太田ら (2014) によって100~4,000L規模水槽でのツボワムシ連続培養手法が報告され、従来の施肥法の問題点を解決するのに有効な手法の示唆となったが、用いたツボワムシ株は、個体群増殖率を低下させる両性生殖が起こりにくい株で大量培養に適していた。しかし、そのことは、耐久卵が形成されないため周年にわたる継代培養が必要なことも意味している。また、餌料にクラミドモナス *Chlamydomonas* sp.を用いるため、その培養に労力

*1 福島県水産事務所相馬駐在
〒976-0022 福島県相馬市尾浜字追川18-2
Fukushima Prefectural Fishery Office Soma Branch Office
18-2 Oikawa, Obama, Soma, Fukushima 976-0022, Japan
niizeki_kouji_01@pref.fukushima.lg.jp

*2 福島県内水面水産試験場

を要する。

ツボワムシ培養に使用する容器に関して、田中（1983）は20L水槽で実験した結果から、小型容器の方が管理しやすく、好適環境を維持しやすいと考察している。そこで本研究では、小型容器による、市販の濃縮淡水クロレラを用いた、耐久卵作成手法の検討を行った。今回、野外から採取したツボワムシから耐久卵を得て、それからふ化したツボワムシを元種に培養試験を行った結果、ワムシ密度が100個体/mL以上で32日間にわたる培養が可能になった。これらの手法および培養結果について報告する。

材料および方法

福島県内水面水産試験場内のコンクリート屋外池（285m³）の水をポリバケツで10L採水し、プランクトンネットで濾過し、動物プランクトンを採取した。採取した動物プランクトンは倒立顕微鏡（CKX31, OLYMPUS）で検鏡しながら、ピペットで原生動物を出来る限り除去

し、ツボワムシのみを約3,000個体分離した。分離後のツボワムシは以下の培養手法（図1）により培養した。

培養は、地下水を入れた計量カップ（5L容、ポリプロピレン製）を、25°Cに調温した恒温器（MIR-152, SANYO）内に置いて行った。恒温器内にはLED電球（白色、7.2W、100V）を設置し、照明は12L：12Dで調整した。通気はエアポンプ（APN-057R, REI-SEA）で行

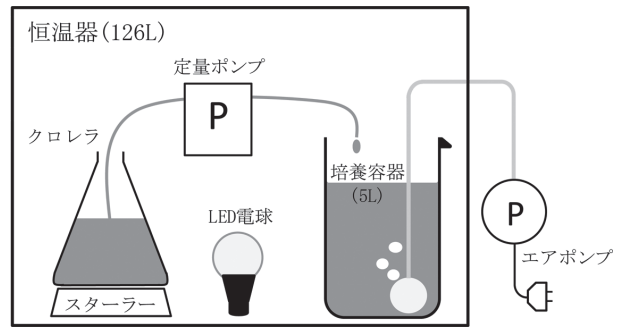


図1. ツボワムシ培養手法
エアポンプ以外の器具は全て恒温器内に設置

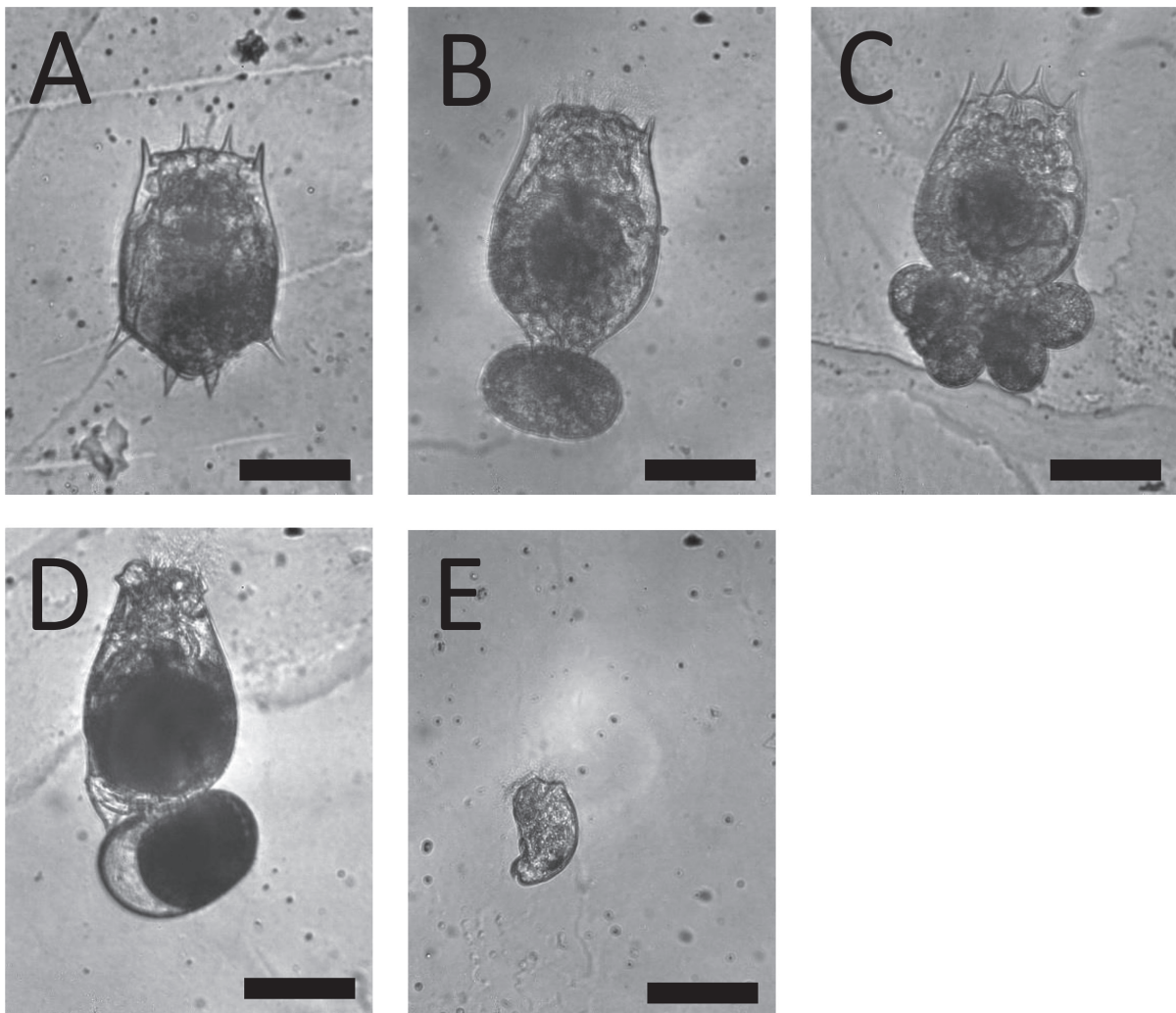


写真1. ツボワムシ雌個体および雄個体の形状
A：未携卵雌（後向棘が伸長した変異型）、B：雌卵携卵雌、C：雄卵携卵雌、D：耐久卵携卵雌、E：雄
実線のスケールは0.1mmを示す

い、通気量は15mL/分とした。餌料には、市販の濃縮淡水クロレラ（生クロレラV12, クロレラ工業, 以下, クロレラ）を用い、水道水で100倍に希釈したものを3L三角フラスコに入れ、定量ポンプ(SJ-1211H, ATTO)で0.2L/日量を連続給餌した。なお、クロレラの沈殿防止のために、スターラー (MH-61, Yamato) で常時攪拌した。培養による沈殿物を除去して培養環境を維持するために、ツボワムシ個体を含む培養水を定期的に新しい容器に移し替えた（以下、植替え）。耐久卵の採取は、屋外池の水から分離したツボワムシを5日間培養したところ、耐久卵が認められたため、培養容器底面の沈殿物をプランクトンネット（目合い：58μm）で濾過して行った。耐久卵はビーカーに収容し、水を加えた状態で冷蔵庫内（4°C）に16ヶ月間保存した。培養試験は、耐久卵106個を0.4Lの地下水を入れてふ化したものを用いて行った。

シオミズツボワムシ *Brachionus plicatilis* では、両性生殖の誘導要因は飼育に伴って水中に蓄積する何らかの物質であることが、換水率を高くすると両性生殖率が低下した実験結果から推察されている (Hino and Hirano 1977)。植替えによる環境維持と両性生殖誘導の両立が可能かを検討するため、植替え間隔が7日間と4日間で試験を行った。各試験とも耐久卵からふ化させたワムシを用い、試験1では、ワムシ密度が10個体/mL以上の培養水0.5Lずつを培養容器に入れて11日間培養した（試験区：植替えなし区、植替えあり1区、植替えあり2区）。試験2では、ワムシ密度が100個体/mL以上の培養水0.5Lずつを培養容器に入れて32日間培養した（試験区：植替えなし区、植替えあり区）。試験2では、溶存酸素濃度 (DO) および pH を水質測定器 (550A, YSI/Nanotech, HM-60V, TOA) を用いて測定した。

培養期間中は、毎日9:00~11:00の間に培養水をピペットで1mL採水し、培養水中の雌個体（未携卵、雌卵携卵、雄卵携卵、耐久卵携卵）および雄個体を計数した（写真1）。採水および計数は2回行い、個体密度を平均値で算出した。その際、計数値の総計に20%以上の差があった場合、採水からやり直した。なお、本稿で述べる個体密度は雌個体合計とする。雌個体については、次式により比増殖率を求めた。

$$\text{比増殖率}(r) = \ln(Nt/N_0)/t + D,$$

ここで、 t は培養日数、 N_0 は開始時の個体密度、 Nt は t 日目の個体密度、 D は培養水の希釈率を示す。さらに、比増殖率を求めた上で、次式により日間増殖率を求めた。

$$\text{日間増殖率}(\%) = (e^r - 1) \times 100$$

雌卵携卵雌個体率は、雌卵携卵雌個体密度を個体密度で除して求めた。

結 果

耐久卵からふ化させたツボワムシを14日間培養した結果の概要を図2に示す。ふ化ワムシは開始1日目には

13個体（個体密度0.03個体/mL）が確認され、その後は個体密度を増やし12日目には最大657個体/mLに達したが、以後減少した（図2A）。なお、耐久卵からのふ化は1日目で終了し、ふ化率は12.3%であった。雌卵携卵雌個体は開始1日目から認められ、雌卵携卵雌個体率は4日目には最大31%に達したが、その後徐々に減少し、平均では17%であった（図2G）。両性生殖に関連する雄卵携卵雌個体（図2C）および雄個体（図2E）は6日目から、耐久卵携卵雌個体（図2D）は8日目からそれぞれ確認され、共に一時的に増加したものの、13日目からは認められなくなった。平均日間増殖率は、192%であった（図2F）。

植替え間隔が7日間と4日間で培養結果の概要を図3に示す。試験1においては、個体密度は植替えなし区が4日目に最大524個体/mLとなり、その後減少した。7

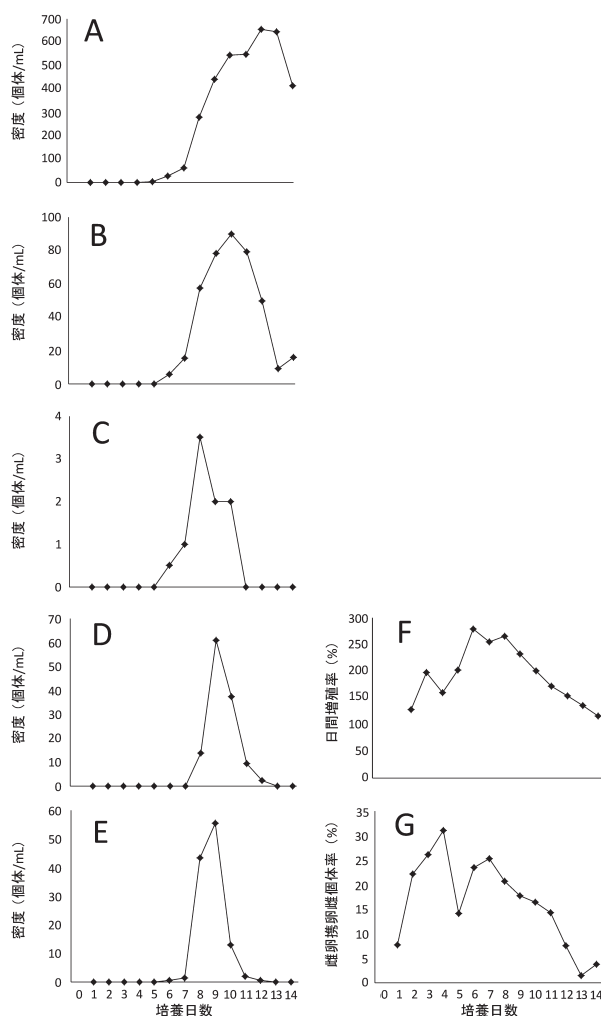


図2. 耐久卵からふ化したツボワムシ密度、日間増殖率、雌卵携卵雌個体率の推移
 A: 個体密度（雌個体の合計）、B: 雌卵携卵雌、C: 雄卵携卵雌、D: 耐久卵携卵雌、E: 雄、F: 日間増殖率、G: 雌卵携卵雌個体率
 日間増殖率(%) = $(e^r - 1) \times 100$
 r : 比増殖率
 雌卵携卵雌個体率(%) = 雌卵携卵雌個体密度 / 個体密度 $\times 100$

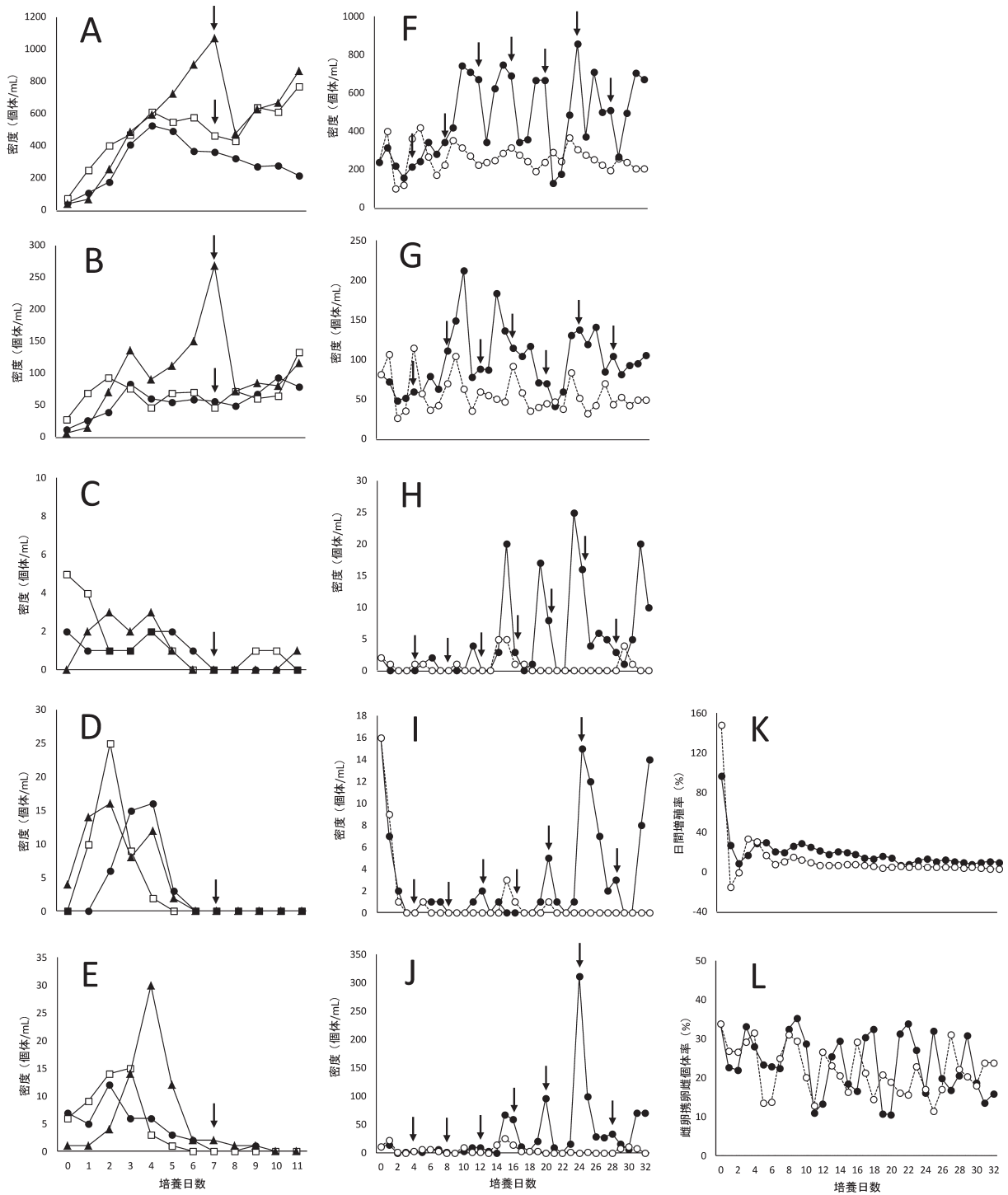


図3. 培養試験におけるツボワシ密度、日間増殖率、雌卵携卵雌個体率の推移
 試験1, A: 個体密度(雌個体の合計), B: 雌卵携卵雌, C: 雄卵携卵雌, D: 耐久卵携卵雌, E: 雄, ●: 植替えなし区, □: 植替えあり1区, ▲: 植替えあり2区
 試験2, F: 個体密度(雌個体の合計), G: 雌卵携卵雌, H: 雄卵携卵雌, I: 耐久卵携卵雌, J: 雄, K: 日間増殖率, L: 雌卵携卵雌個体率, ●: 植替えあり区, ○: 植替えなし区
 図中の矢印は試験1の植替えあり1区, 植替えあり2区および試験2の植替えあり区における植替え日を示す
 試験2の植替えなし区では25日目に容器が満水になったため, 1L分の培養水を廃棄
 $\text{日間増殖率}(\%) = (e^r - 1) \times 100$
 r : 比増殖率
 $\text{雌卵携卵雌個体率}(\%) = \text{雌卵携卵雌個体密度} / \text{個体密度} \times 100$

日目に植替えした植替えあり1区および2区では植替え直後に密度は低下したが, その後は増殖し, 11日目は共に700個体/mL以上となった(図3A)。

試験2において, DOおよびpHは, それぞれ植替えなし区が1.01~3.20mg/L, 7.62~7.98, 植替えあり区が2.03~4.79mg/L, 7.49~7.99の範囲であった。試験2に

おける平均個体密度（最小～最大）は植替えなし区の260個体/mL（98～422）に対して、植替えあり区では462個体/mL（131～857）と有意に高かった（ $p < 0.0001$, Mann-Whitney U test, 図3F）。平均日間増殖率は、植替えあり区が18.9%、植替えなし区が11.8%であった（図3K）。雄卵携卵雌個体（図3H）および雄個体（図3J）は、植替えあり区では培養14日後以降に頻繁に出現したが、植替えなし区における出現は少なかった。耐久卵携卵雌個体は、両試験区ともに培養開始直後に多く出現し、植替えあり区では培養後半にかけても出現した（図3I）。なお、全ての培養において、ワムシ計数時に少数の原生動物が観察される場合があったが、原生動物によりワムシの増殖や活性が阻害される状態は認められなかった。

考 察

Pourriot and Snell (1983) は、若い個体ほど減数分裂を伴う両性生殖雌個体を産みやすいと報告している。培養試験において、耐久卵の形成頻度が新規に培養を開始した直後に高かったことは、培養直後の個体群組成に若齢個体が多く含まれていた可能性がある。シオミズツボワムシの場合、水温25°C以下で形成された耐久卵からふ化した系群は、両性生殖頻度が高まることが報告されている（Hino and Hirano 1985, 日野1997）。今回実施した複数の培養試験では、いずれにおいても耐久卵形成が確認された。シオミズツボワムシの条件がツボワムシに直接当てはまるとは限らないが、本手法は培養装置を25°Cに調整しており、両性生殖誘導に適した環境であった可能性がある。

耐久卵の形成条件として、シオミズツボワムシの場合では、耐久卵保存時の水温と光により、ふ化したクローンの両性生殖頻度が異なること（Hagiwara and Hino 1989）、耐久卵からふ化した個体は、飢餓状態を経験すると、以降の世代の両性生殖頻度が高まること（Hagiwara et al. 2005）が報告されている。これらのことから、耐久卵の形成には、培養時と耐久卵保存時における、水温や照明（強度、波長、時間）等の環境条件および餌料条件が大きく関与していると考えられる。また、試験1および2の結果では、植替えを4日間隔で実施した方が7日目に1度植替えを実施するより両性生殖頻度が高くなっている。植替えすることで、培養環境が良好な状態で維持され、かつ両性生殖誘導要因を阻害することなくツボワムシ活性が維持された可能性がある。今後、より集約的に耐久卵を収穫するため、前述した環境条件、餌料条件、植替えの頻度を踏まえて、詳細な検討を加える必要がある。

本試験から、ツボワムシは耐久卵による保存が可能であり、本手法を用いることで1ヶ月以上にわたりツボワムシを培養できることが明らかとなった。高密度で長期間の培養を維持するためには、植替えを実施することが効果的であると考えられた。今後は、本手法を基に、ツボワムシの培養および利用に関して多方面の展開が期待される。

文 献

- 千葉健治・栗原伸夫・富永正雄（1970）養魚講座第1巻 鯉（大島泰雄・稲葉伝三郎編）. 緑書房, 東京, p.166 - 179.
- Hagiwara A and Hino A (1989) Effect of incubation and preservation on resting egg hatching and mixis in the derived clones of the rotifer *Brachionus plicatilis*. *Hydrobiologia*, **186/187**, 415 - 421.
- Hagiwara A, Kadota Y, Hino A (2005) Maternal effect by stem females in *Brachionus plicatilis*: effect of starvation on mixis induction in offspring. *Hydrobiologia*, **546**, 275 - 279.
- Hino A and Hirano R (1977) Ecological studies on the mechanism of bisexual reproduction in the rotifer *Brachionus plicatilis*-ii effects of cumulative parthenogenetic generation on the frequency of bisexual reproduction. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **43**, 1147 - 1155.
- Hino A and Hirano R (1985) Relationship between the temperature given at the time of fertilized egg formation and bisexual reproduction pattern in the deriving strain of the rotifer *Brachionus plicatilis*. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **51**, 511 - 514.
- 日野明德（1997）ワムシ生活史の人為的制御. 月刊海洋号外, **12**, 62 - 66.
- 中本 崇・稲田善和・牛嶋敏夫・萩原篤志（2007）通気装置の改良によるタマミジンコ *Moina macrocopa* の高密度大量培養. 水産増殖, **55**, 423 - 429.
- 新関晃司・渡邊昌人・泉 茂彦（2014）施肥法による動物プランクトン出現動向およびウグイ仔魚放養時期の検討. 水産増殖, **62**, 445 - 452.
- 太田滋規・幡野真隆・三枝 仁・久米弘人・白杵崇広・根本守仁・関 慎介・磯田能年（2014）淡水ワムシ（ツボワムシ *Brachionus calyciflorus* PALLAS）大量培養マニュアル. 滋賀水試研報, **55**, 153 - 197.
- Pourriot R and Snell T W (1983) Resting eggs in rotifers. *Hydrobiologia*, **104**, 213 - 224.
- Sato R (1950) On feeding habits of the larva of pond smelt, *Hypomesus olidus* (PALLAS). *Tohoku Jour. Agri. Res.*, **1**, 215 - 222.
- 鈴木俊一（1971）ドジョウの種苗生産に関する研究-V 天然初期餌料としてのツボワムシの効果. 滋賀水試研報, **23**, 11 - 18.
- 田中寿雄（1983）淡水産ツボワムシ *Brachionus calyciflorus* の大量培養の可能性. 水産増殖, **31**, 72 - 77.