

シオミズツボワムシ *Brachionus plicatilis* の培養初期に おける増殖メカニズム

斎藤俊郎^{*1}・大森文人^{*2}・渡部終五^{*3}

Some of Observations of the Population Growth Mechanism in Early Stage of the Rotifer *Brachionus plicatilis* Culture

Toshio SAITO, Fumito OOMORI, and Shuugo WATABE

Abstract

Population growth pattern of the rotifer *Brachionus plicatilis* was studied by evaluating the lag phase in three samples with varying density (0.6, 3 and 6 ind ml⁻¹) and each containing 5 ml of culture medium. The cultures showed a shorter lag phase in the samples with higher density. This result suggests that the physiology and metabolic activity of the rotifers were influenced by the density of the samples. Influence of output products (egestion and excretion) of rotifers on population growth was further examined under the present investigation. For this purpose, rotifers were cultured in filtered medium of different concentrations (25%, 50%, 75% and 100%) along with a standard (0% filtered medium). After a fixed time lag, it was noticed that the number of rotifers in the filtered medium was significantly higher ($p < 0.05$) than that of the standard. Such result clearly indicates inducing effect of the output product on the exponential growth phase of the rotifer population.

緒 言

シオミズツボワムシ *Brachionus plicatilis* (以下、ワムシ) は、仔稚魚の餌料として広く利用されており、海産魚類の増養殖に不可欠な動物プランクトンとなっている。また、本種は迅速かつ容易に培養できるため、ポピュレーションダイナミクス研究の対象としても用いられている。

ワムシを培養して成長曲線を描くと、シグモイド曲線と呼ばれるS字型カーブとなることが知られている (Yoshinaga *et al.*, 2001)。すなわち、培養開始から直ぐに増殖が始まるのではなく、一見増殖が不活発と見えるタイムラグ (誘導期) を経た後に増殖が促進され、対数増殖期が始まる。その後増殖率は徐々に低下し、横這い状態を呈する定常期を経て、ついには減少してゆくこととなる。

ワムシの培養については、「いかに早く多量に本種を培養するか」との産業上の必要性も在り、上記シグモイド曲

線となるメカニズム、言い換えれば、ワムシの増殖に促進や停滞が生ずるメカニズムについて種々研究されてきた (吉村他, 1994; Yoshinaga *et al.*, 1999; 小磯他, 2001; 小磯他, 2002)。しかしそれら研究の対象は、主に対数増殖期あるいは定常期以降に限られ、誘導期のメカニズム、言い換えれば、誘導期におけるワムシの生理や生態については明らかにされて来なかった。このため、ワムシ誘導期のメカニズム、特に誘導期を経て始めて増殖が促進される理由については、全く分かっていない。

ワムシの増殖メカニズムに関しては、対数増殖期のワムシ培養濾液が、ワムシの増殖を促進することが知られており、ワムシが自身の増殖を促進する物質を分泌していることが示唆されている (Yoshinaga *et al.*, 1999)。しかし、この指摘は主に対数増殖期に限られており、誘導期から対数増殖期の過程においても、ワムシ代謝産物が自身の増殖に影響を及ぼすか否かについては検討されていない。

以上の状況を踏まえ、本研究では誘導期のワムシの生理

2007年1月24日受理

*1 東海大学海洋学部海洋生物学科 (Department of Marine Biology, School of Marine Science and Technology, Tokai University)

*2 東海大学大学院海洋学研究科海洋生物科学専攻 (Graduate School of Marine Science and Technology, Course of Marine Bioscience)

*3 東京大学大学院農学生命科学研究科水圏生物工学研究室 (Aquatic molecular Biology and Biotechnology, Graduate School of Agricultural and Life Sciences, The University of Tokyo)

や生態、さらには誘導期から対数増殖期にかけての増殖メカニズムを明らかにする一環として、以下の2つについて検討することとした。

一つは、培養開始時のワムシ数の違いが、誘導期の期間の長短に与える影響を検討することである。というのは、前述したように、ワムシの増殖メカニズムに関する研究の中で、これまで誘導期についてはほとんど対象とされてこなかったからである。そのため、誘導期が如何なる要因によって変化するかについても明確でない。誘導期ワムシの増殖が、自身の代謝産物によって促進されるならば、培養開始ワムシ数が多い方が誘導期は短縮されることとなる。この点からも今回本課題を検討することにした。

二つは、代謝産物が誘導期ワムシの増殖を促進することを確認するために、ワムシ培養濾液を添加した培地でワムシを培養することにした。

材料と方法

1. 供試株および餌料

供試株は、東京大学大学院農学生命科学研究科水圏生物工学研究にて継代培養されていたシオミズツボワムシ *Brachionus plicatilis* 石川株を、当研究室に搬入したものである。

ワムシの餌料には、毎月定期的に購入した *Chlorella vulgaris* (日海センター) を用いた。なお、以下の全ての培養では供試ワムシの餌として上記を用いた。

2. 前培養

実験に先立ち、ワムシの世代および生理状態を一定に保つために以下の方法で前培養を行った。すなわち、まず、継代培養したワムシの中から抱卵した親個体のみを選別し、この世代を含めて3世代目の個体を供試ワムシとした。以下その詳細を述べる。

継代培養したワムシから選別した親個体を、培養液(後述)の入ったシャーレ(直径40mm)に入れ、その中からさらに20個体を選び、これらを培養液3mlが入った別のシャーレに移し24時間培養した。培養後、新たに孵化した新規個体(<2時間齢)20個体を別のシャーレに選んで24時間培養後、再び新たに孵化したワムシ20個体(<2時間齢)を選別、上記と同型・同大の別のシャーレで24時間培養し、孵化した個体を供試ワムシとした。

なお、培養液には、0.45 μ m フィルター(MILLIPORE)で滅菌濾過した Brujewicz 人工海水(Subow, 1931)、塩分濃度 PSU33 を用いた。培養条件は、温度 25 $\pm$ 1 $^{\circ}$ C、24時間暗条件、静置培養で、投餌は1日1回であった。以下の全ての培養では、1回の投餌量には若干の違いがあるが、培養液および培養条件は上記と全て同じである。本前実験での1回の投餌量は、クロレラを 5 $\times$ 10⁶ cells/ml の濃度で 0.1ml であった。

3. 培養開始時に個体数を違えてのワムシ培養

培養開始ワムシ数の検討では、予備実験結果から、誘導期が10日前後と長期となる 0.6個体/ml を最小として、その5倍の3個体/ml および10倍の6個体/ml の計3試験区を設定した。各試験区では、以下の培養実験を行った。

容量 20ml の試験管を3本用意し、それぞれに 5ml の培養液を入れる。次いで、ワムシを先に規定した個体数、例えば、0.6個体/ml 試験区ならば各3個体入れ、前述した前培養と同様の条件で20日間培養した。培養日数ごとのワムシ数の計測では、各試験管をよく攪拌した後に 1ml ずつシャーレに採取して、10% ホルマリンを適量加えてワムシを固定した。計数は実体顕微鏡下で行った。上記3本の試験管の各ワムシ数の平均を、その試験区のワムシ数とした。投餌は、ワムシ数計測のために各試験管から培養液 1ml を採取した直後に行い、クロレラ 0.5 $\times$ 10⁶ cells/ml の濃度を 1ml 与えた。そのため、各試験管の培養液量は常に 5ml であった。

また、各試験区のワムシの誘導期における比増殖率を小磯ら(2001)の方法を用いて以下の式から求めた。

$$\text{比増殖率} : r = \ln(N_t/N_0)/t, \text{ただし, } dN/dt = rN$$

r : 比増殖率, N : ワムシ数, t : 培養日数

4. 培養濾液添加実験

4-1 培養濾液の作製

培養濾液添加実験に先立ち、ワムシ代謝産物を含有する培養濾液を作製した。なお、以下の作業はインキュベーション以外は、全てクリーンベンチ内で行った。

まず、容量 20ml の試験管を3本用意し、それぞれに培養液を 5ml と前培養したワムシを30個体入れて5日間培養した。前実験の結果により、この時点のワムシの成長曲線は誘導期を終了し対数増殖期に入った時期すなわち、対数増殖期の初期であることが確かめられている。培養5日後には3本の培養液を合一して計 15ml とし、これを 0.45 μ m フィルター(MILLIPORE)で吸引濾過して培養濾液約 12ml を得た。

4-2 培養濾液添加培地でのワムシ培養

実験の方法を簡潔に示すと、培養プレート(12穴、6ml/穴、直径 23.5mm; FALCON 製)に培養濾液を各 25, 50, 75, 100% 添加した培養濾液添加区(以下それぞれ 25, 50, 75, 100% 各濾液添加区)と培養液のみの対照区(0% 培養濾液添加区)の5試験区を設定し、各試験区でワムシを培養、そのワムシ数を各区で比較した。

まず、上記それぞれの試験区を誤差が均一になる様に、ラテン方格法に従い培養プレートに配置し(図1)、各試験区に5つの培養穴を設けた。各培養穴には、各濃度の培養濾液を 1ml 入れた。この場合、25% 濾液添加区では培養濾液を 0.25ml ずつ添加した後培養液の人工海水(前述)を 0.75ml ずつ加え、各計 1ml とした。同様に濾液

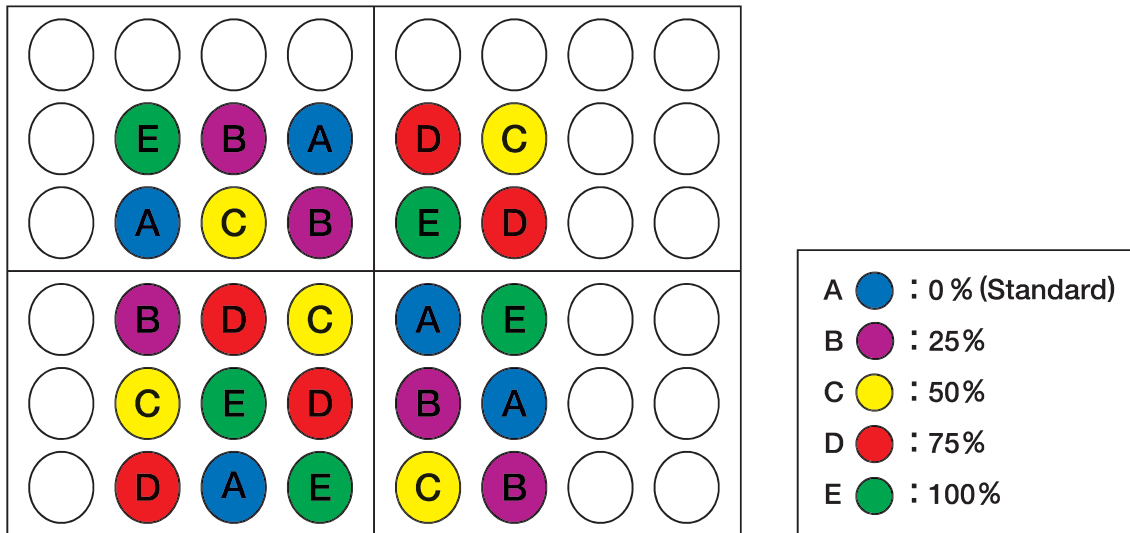


Fig. 1 Experimental set up for treatment of rotifer samples by adding filtered medium of different concentrations (25%, 50%, 75% and 100%) and the artificial sea water as the standard.

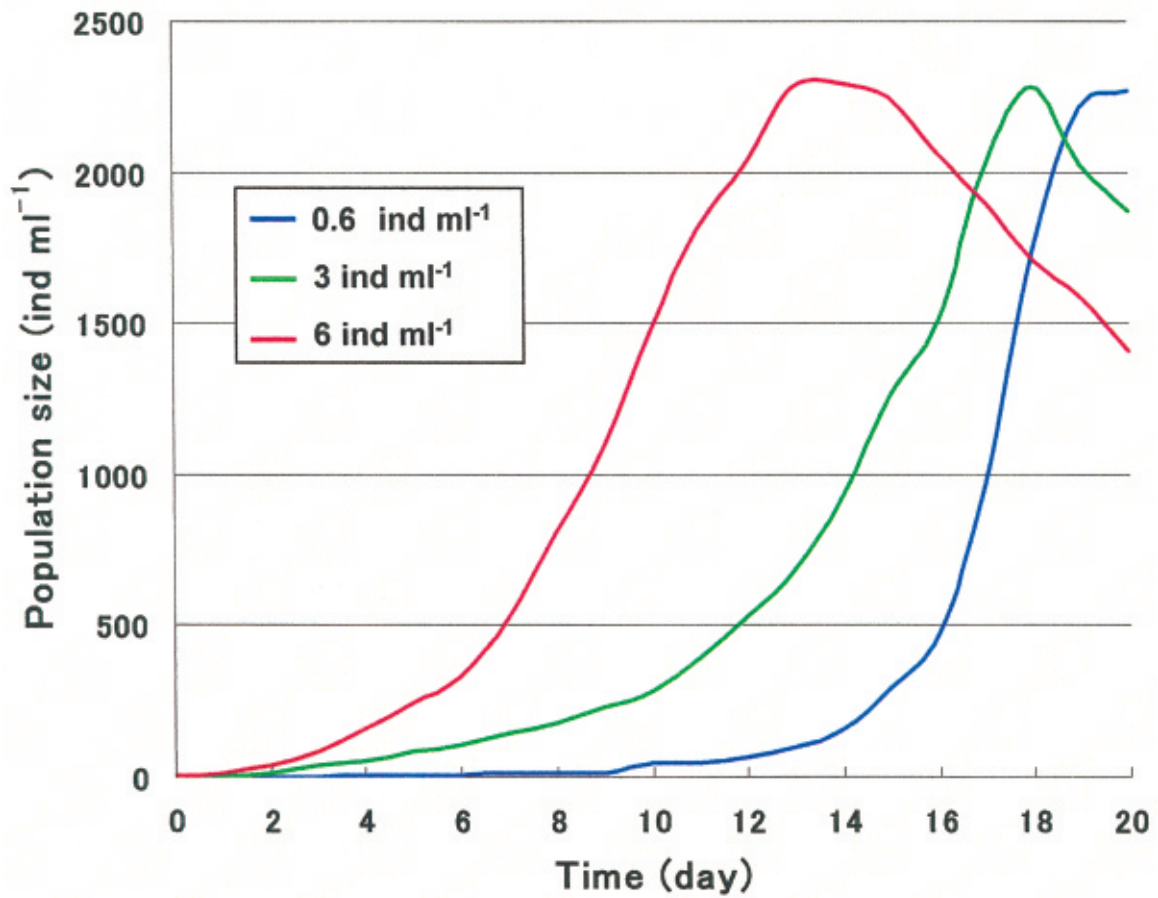


Fig. 2 Growth pattern curves of the rotifer samples cultured in the artificial sea water with different initial number of individuals.

50, 75および100% 各添加区を設定した。なお、培養時の乾燥を防ぐため、試験区以外の培養プレートの穴は蒸留水で満たした。

次に、各試験区にワムシを2個体入れて、毎日ワムシ数を計測した。ワムシ数計測に際しては、各試験区のワムシを双眼実体顕微鏡下で直接カウントした。投餌の際は、まず各試験区からワムシを吸い込まぬように注意しながら培養液を0.05ml 取り出し捨て、代わりに餌料 (0.5×10^6 cells/ml) を0.05ml 添加し、各培養液の容積を1 ml に保った。なお、投餌により培養液が濁りワムシがカウントし難くなることを考慮し、投餌はワムシ数計測直後に行った。また投餌の際、培養濾液が希釈されない様に、各試験区の餌料は、各試験区と同濃度の培養濾液を添加した。

5. 増殖促進効果の判定

培養濾液によるワムシ増殖促進の有無については、一元分散分析法で判定した。

結 果

1. 培養開始時に個体数を違えてのワムシ培養

図2に培養開始時ワムシ数ごとの成長曲線を示した。

本結果を端的に述べると、培養開始時のワムシ数が多いほど誘導期が短縮し、その分早期に対数増殖期に入り、定常期そして衰退期へと移行した。

ワムシ数0.6個体/ml 試験区では、培養9日目までは誘導期にあったが、その後対数増殖期となり培養18日目ほどで定常期に移行したが、培養20日目ではまだ衰退期入らなかった。

3個体/ml 試験区では、培養4日目までは誘導期にあったが、その後対数増殖期となり、培養16日目頃から定常期に移行すると直に衰退期となった。本試験区での誘導期は、0.6個体/ml 試験区と6個体/ml 試験区の間位置した。

6個体/ml 試験区では、培養3日目までは誘導期にあったが、その後対数増殖期に入り、培養13日目頃に定常期に移行すると、徐々にワムシ数が減少し、培養15日目には衰

Table 1 Variation in the number of rotifers in the filtered medium of different concentrations and the standard at different time lag

Concentration	Sample No.	No. of ind ml ⁻¹				
		1 day time lag	2 days time lag	3 days time lag	4 days time lag	5 days time lag
0% (Standard)	1	2	6	12	22	30
	2	3	8	11	25	48
	3	2	6	12	29	59
	4	2	5	9	15	38
	5	2	4	8	16	33
	Mean±SD	2±0.4	6±1.5	10±1.8	21±5.9	42±11.9
25% filtered medium	1	2	4	9	20	36
	2	2	7	10	23	46
	3	2	9	14	30	58
	4	2	8	11	40	77
	5	2	6	11	32	63
	Mean±SD	2±0	7±1.9	11±1.9	29±7.9	56±15.8
50% filtered medium	1	3	9	19	39	76
	2	2	7	13	32	74
	3	2	8	15	33	74
	4	2	6	15	36	76
	5	2	6	15	28	67
	Mean±SD	2±0.4	7±1.3	15±2.2	34±4.2	73±3.7
75% filtered medium	1	2	8	15	43	83
	2	2	7	16	34	80
	3	3	9	19	42	91
	4	2	5	12	29	71
	5	2	11	19	35	83
	Mean±SD	2±0.4	8±2.2	16±2.9	37±5.9	82±7.2
100% filtered medium	1	2	9	16	34	75
	2	3	12	19	50	98
	3	2	10	17	35	92
	4	3	8	18	34	70
	5	2	9	18	45	77
	Mean±SD	2±0.5	10±1.5	18±1.1	40±7.4	82±12.0

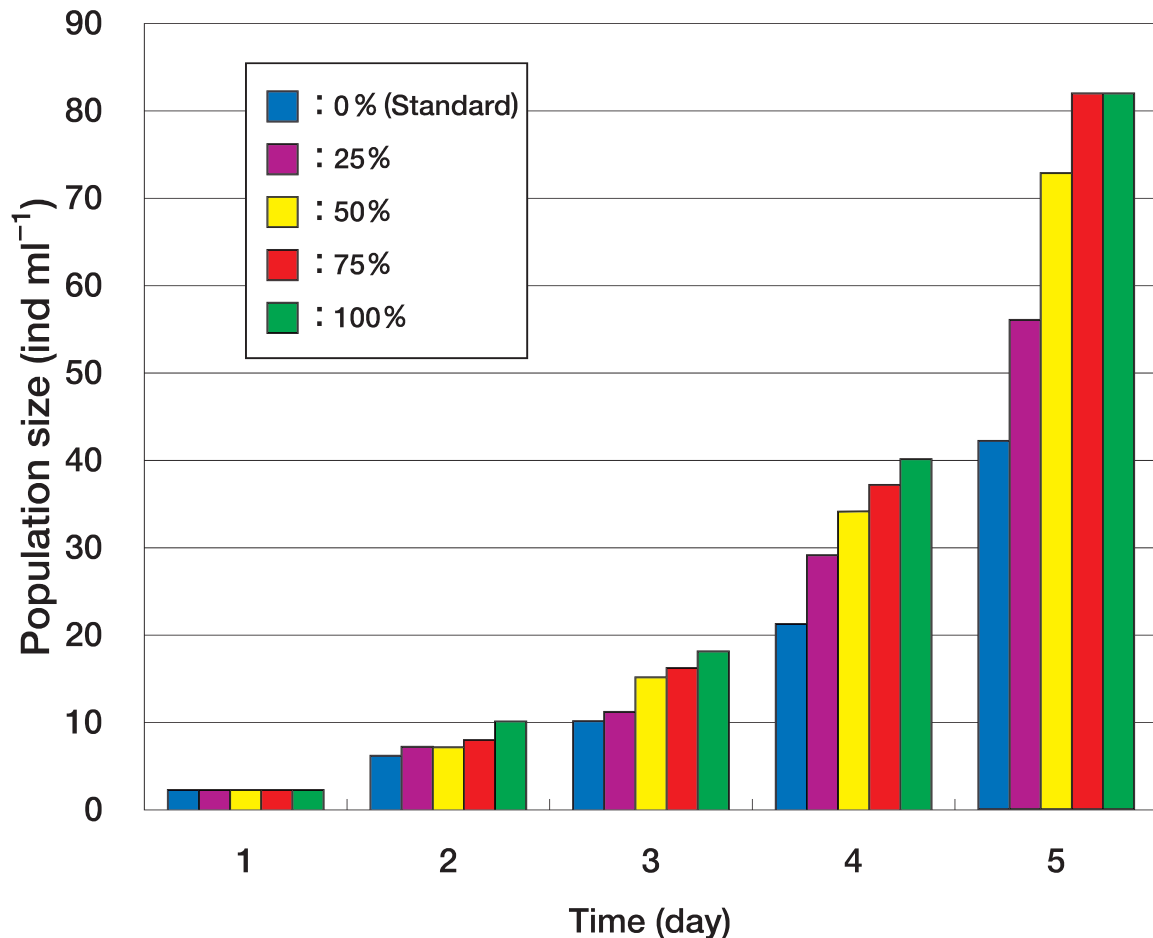


Fig. 3 Daily variation in the average number of rotifers by adding filtered medium of different concentrations (Fig. 1).

退期に移行した。

2. 培養濾液添加実験

表1に各濃度の培養濾液でワムシを5日間培養した時の培養日数別、試験区別ワムシ数を示した。また、図3には培養開始後5日間の各試験区の平均ワムシ数を示した。

表1から分かるように、100%濾液添加区の平均ワムシ数は、既に培養2日目で 10 ± 1.5 個/mlとなり、他の試験区の中で最も多くなっている。この時の対照区の平均ワムシ数は 6 ± 1.5 個体/mlである。その後、日増しに対照区に比べ培養濾液添加区の平均ワムシ数が増加した。

培養4日目では、培養濾液添加区の中でも濃度の高い、50, 75, 100%濾液添加区の平均ワムシ数がそれぞれ 34 ± 4.2 , 37 ± 5.9 , 40 ± 7.4 個体/mlとなり、対照区の 21 ± 5.9 個体/mlや25%濾液添加区の 29 ± 7.9 個体/mlに比べて多い。培養5日目では、平均ワムシ数は対照区が 42 ± 11.9 個体/mlであるのに対して、75および100%各濾液添加区では、いずれも 82 ± 7.2 , 82 ± 12.0 個体/mlと、約2倍の値を示した。

考 察

1. 培養開始時個体数を違えてのワムシ培養

今回の結果から、培養開始時のワムシ数が多い程誘導期が短縮することが確かめられた。また、比増殖率は、培養開始時ワムシ数が、0.6, 3および6個体/mlと多くなるにつれ、それぞれ0.36, 0.71および0.89と増加した。この結果は、培養開始時のワムシ数が多い程ワムシがより活発に増殖することを示唆している。そこで、この短縮が起こる原因について考えてみたい。

誘導期短縮の要因としては、まずワムシ自身に起因することが考えられる。何故かといえば、培養水に新たな溶剤を添加していない以上、ワムシの環境としての培地の水質に変化が生じたとは考え難いからである。そのため誘導期が短縮する主原因は、ワムシの活動や生理に起因すると思われる。そこで、「誘導期の間にワムシは何を行っているか」が問題となる。著者は、この期間既にワムシは、代謝産物を体外に分泌していると考えた。

ワムシ代謝産物が自身の増殖を促進する点については、Yoshinaga *et al.* (1999) や小磯ら (2002) によって既に

Table 2 Results from the analysis of variance carried out for the standard and filtered medium of different concentrations at the time lag of 1-5 days

Significant error → 0.05				
1 day time lag	25% filtered medium	50% filtered medium	75% filtered medium	100% filtered medium
Standard				
25% filtered medium				
50% filtered medium				
75% filtered medium				
100% filtered medium				
Significant error → 0.05				
2 day time lag	25% filtered medium	50% filtered medium	75% filtered medium	100% filtered medium
Standard				*
25% filtered medium				*
50% filtered medium				*
75% filtered medium				
100% filtered medium				
Significant error → 0.05				
3 day time lag	25% filtered medium	50% filtered medium	75% filtered medium	100% filtered medium
Standard		*	*	*
25% filtered medium		*	*	*
50% filtered medium				
75% filtered medium				
100% filtered medium				
Significant error → 0.05				
4 day time lag	25% filtered medium	50% filtered medium	75% filtered medium	100% filtered medium
Standard		*	*	*
25% filtered medium				*
50% filtered medium				
75% filtered medium				
100% filtered medium				
Significant error → 0.05				
5 day time lag	25% filtered medium	50% filtered medium	75% filtered medium	100% filtered medium
Standard		*	*	*
25% filtered medium		*	*	*
50% filtered medium				
75% filtered medium				
100% filtered medium				

* Significantly different

報告されている。しかし、これらは対数増殖期におけるワムシの増殖メカニズムを中心としたもので、誘導期あるいは誘導期から対数増殖期初期にかけての増殖メカニズムについては言及していない。今回の結果からは、ワムシは既に誘導期において代謝産物を体外に分泌し、その物質がワムシの増殖を促進したとの可能性が考えられた。

2. 培養濾液添加実験

表2に、各試験区間でのワムシ数の差を一元分散分析法で検討した結果を示した。

培養1日目では各試験区間に有意差 ($p < 0.05$) は認められないものの、2日目からは100%濾液添加区のワムシ数

のみが、対照区、25および50%濾液添加区に比して有意 ($p < 0.05$) に増加した。この結果は、培養濾液濃度の最も高い試験区のワムシが、最も早期に増殖を促進させたことを示している。また今回の結果は、対数増殖期初期に分泌される代謝産物が、誘導期ワムシの増殖を促進させることも示唆している。

上記の結果に加え、3日目には、100%濾液添加区だけでなく、50、75%濾液添加区のワムシ数も対照区さらには25%濾液添加区に比して有意 ($p < 0.05$) に増加してくる。すなわち、この両試験区でも増殖促進が生じてくる。この理由は「50%、75%各濾液添加区でもワムシの分泌する代謝産物が増え、100%濾液添加区と同様に、増

殖を促進させる環境が整った故」と考えるのが合理的と思われる。よって誘導期のワムシは代謝産物を体外に分泌している可能性がある。

また増殖促進が、培養濾液濃度の最も高い 100% 濾液添加区から始まることから、増殖促進のきっかけとなる代謝産物の量には、ある一定量が必要であること、すなわち濃度依存性があることが伺われた。

謝 辞

本研究遂行に当たり、統計処理に関して種々の有益な助言をくださった元東海大学海洋学部水産資源開発課程小椋将弘先生に深謝する。

文 献

小磯雅彦・日野明徳 (2001): 培養水の塩分がシオミズツボワムシの増殖, 塩分コスト, 栄養強化に及ぼす影響, 水産

増殖, **49**(1), 41-46.

小磯雅彦・日野明徳 (2002): 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**(2), 197-204.

Subow, N. N. (1931): Oceanographical tables. U. S. S. R., Oceanogr. Institute, Hydro-meteorol. com., Moscow, 208 pp.

吉村研治・北島 力・宮本義次・岸本源次 (1994): 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**(2), 207-213.

Yoshinaga T., A. Hagiwara and K. Tukamoto (2001): Why do rotifer populations present a typical sigmoid growth curve? *Hydrobiologia*, **446/447**, 99-105.

Yoshinaga T., A. Hagiwara and K. Tukamoto (1999): Effect of conditioned media on the asexual reproduction of the monogonont rotifer *Brachionus plicatilis* O. F. Muller *Hydrobiologia*, **412**, 103-110.

要 約

本研究では、ワムシ培養時に見られる誘導期、さらには誘導期から対数増殖期前期にかけての増殖メカニズムについて検討した。

まず、培養開始時のワムシ数が誘導期に与える影響を調べるために、0.6, 3 および 6 ワムシ個体/ml の 3 試験区を設定し、各 5 ml の培地で培養した。その際、餌料には *Chlorella vulgaris* を用いた。その結果、誘導期の長さはそれぞれ約 10, 6 および 3 日間となり、培養開始ワムシ数が多い程誘導期が短縮する傾向が見られた。本結果は、誘導期の長さを規定する原因が、ワムシ自身にあることを示唆している。次いで、ワムシの代謝産物が自身の増殖に与える影響を見るために、対数増殖期初期由来の培養濾液を用いて 25, 50, 75, 100% の各培養濾液添加試験区および培養液のみの対照区でワムシを培養した。その結果培養濾液濃度が高い試験区程、対照区に比較してより早く有意 (一元分散分析, $p < 0.05$) にワムシ数が増加し、ワムシの代謝産物が誘導期のワムシの増殖を促進することが示された。