

テトラセルミス *Tetraselmis tetrathele* の大量 培養法と餌料価値

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 公開日: 2025-04-24 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 岡内, 正典 メールアドレス: 所属:
URL	https://fra.repo.nii.ac.jp/records/2014278

This work is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License.



綜 説

テトラセルミス *Tetraselmis tetrathele* の大量培養法と餌料価値

岡 内 正 典*

テトラセルミス *Tetraselmis tetrathele* は東南アジア諸国でシオミズツボワムシ *Brachionus plicatilis* O. F. MÜLLER (以下、ワムシと略す) の培養用餌料として用いられている微小藻類である¹⁾。また、近縁種の *T. chuii*, *T. suecica*, *T. maculata* 等はヨーロッパやアメリカで二枚貝類幼生用餌料として広く使われている。ところが、我が国では、これらのテトラセルミス類は実験的に二枚貝類幼生やアワビ幼生用餌料として使用された他は、魚介類稚苗生産に用いられた例がない²⁾。著者らは、テトラセルミスが熱帯域でも繁殖することから、その耐高温性と高い増殖率に着目し、海水馴化クロレラ *Chlorella* spp. (以下、クロレラと略す) の大量培養が難しい梅雨期から夏季にかけて、クロレラに代わるワムシ培養用餌料として有効ではないかと考えた。そして、テトラセルミスの増殖特性やワムシに対する餌料価値を調査し、テトラセルミスで培養したワムシの海産仔稚魚に対する餌料価値を調べたところ、テトラセルミスは屋外での大量培養が可能で、有用な餌料生物であることがわかった。さらに、著者はテトラセルミスの安定した大量培養法や餌料としての活用法を検討中である。

著者は、テトラセルミスの生物学的特性や増殖特性について既に報告したが^{3,4)}、ここではその後得られた知見や培養法のマニュアル、元種 (もとだね) 保存法、海産仔稚魚およびクルマエビ幼生に対する餌料価値についても報告したい。

I. 導入の経緯

今回対象とするテトラセルミスは、1981年5月、シンガポール共和国国家発展省原産局水産増殖センター稚苗生産部長の LIM LIAN CHUAN 氏から分譲されたものである。さらに溯ると、シンガポールで培養されているテトラセルミスは、西ドイツのヘルゴランド海洋研究所からタイ国を経て導入されたものである⁵⁾。

II. 生物学的特性

1. 分 類

今回対象としたテトラセルミスは、ブラシノ藻綱 Prasinophyceae, ブラシノモ目 Prasinocladales, ブラシノモ科 Prasinocladaceae, テトラセルミス属 *Tetraselmis* の1種である。本種を単種に分離した後、筑波大学の千原光雄教授に種の同定を依頼したところ、本種は *Tetraselmis tetrathele* (WEST, G. S.) BUTCHER と同定された。

ブラシノ藻類の分類の歴史的変遷は、千原・堀⁶⁾、千原ら⁷⁾によって詳しく記載されているので、ここでは特に細胞の形態や色が似ているため混同されやすい緑藻類との差について述べる。

歴史的には、フランスの CHADEFAUD が細胞の前端が窪むという形質を重視し、緑藻綱の中に新たにブラシノボルボックス目 Prasinovolvocales を設立し、ボルボックス目 Volvocales と区別した。さらにデンマークの CHRISTENSEN が、この形質を持つ仲間を緑藻綱から独立させて、ブラシノ藻綱 Prasinophyceae を設

* 水産庁養殖研究所遺伝育種部育種研究室

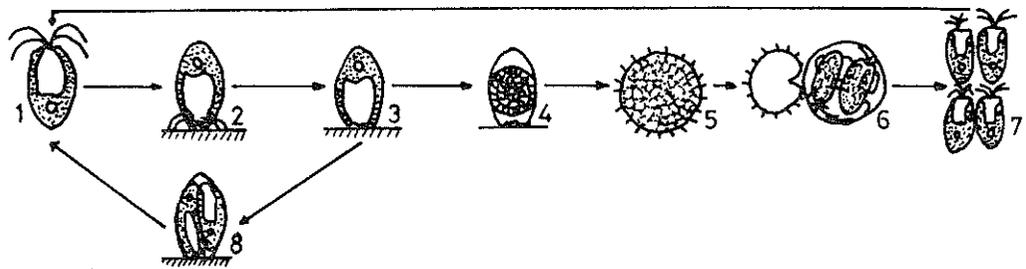


図1 テトラセルミス *Tetraselmis* (= *Platymonas*) sp. の生活史。1→2→3→8 は栄養体細胞による増殖，1→2→3→4→5→6→7 は厚膜シスト形成による増殖を示す (高原・堀 1975)¹⁴⁾。

立した⁵⁾。たとえば，緑藻綱ボルボックス目には餌料生物として使用されているドゥナリエラ *Dunaliella tertiolecta* やクラミドモナス *Chlamydomonas* sp. が含まれている。これらの緑藻類と比べてブラシノ藻類には次のような特徴がある。1) 多くの種では細胞の前端が窪み，その底部から鞭毛が突出している（単細胞遊泳性の緑藻類は体が卵形で，その尖った前端から鞭毛を出す）。2) 細胞壁の主要構成成分は，加水分解によりガラクトースやウロン酸を産出する物質からなる（緑藻類の細胞壁はセルロースである）。3) 鞭毛の先端は鈍頭で，その表面には小毛が生えている，いわゆる“ひも型鞭毛”である（緑藻類の鞭毛は先が細く伸びた“むち型鞭毛”である）⁶⁾。また，電子顕微鏡による細胞内器官や鞭毛の観察から，ブラシノ藻類は緑藻類よりも原始的な性質を多く持ち，緑色植物の系統発生を研究するうえで重要な藻類として注目されている⁷⁾。

テトラセルミスの含まれるブラシノモ目はブラシノモ科だけから成るとされている。ところが属の分類に関しては，分類学者の間で議論の分かれるところである。最近，NORRIS らは⁸⁾，培養と電子顕微鏡を用いて細胞内器官を詳細に調べた結果，テトラセルミス属の1属に統合することが適当であるとの見解をとっている。さらに堀らは^{9,10)}，ピレノイド構造の観察により4亜属（テトラセルミス亜属 *Tetraselmis*，プラチモナス亜属 *Pratymonas*，ブラシノモ亜属 *Plasinocladus*，アウラコクラミス亜属 *Aulacochlamys*）に分類できることを提唱している。

一方，水産増殖の研究分野でもテトラセルミス属に含まれる藻類をプラチモナス *Platymonas* の属名で報告している例が多い。かつて，我が国でもプラチモナスの属名を採用する研究者が多かった。その原因は，古くは BUTCHER¹¹⁾ が WEST の命名したプラチモナス属は STEIN が命名したテトラセルミス属のシノニムであることを指摘したものの，その後も分類学的に両属を統合するに足る詳細な観察による決定的な証拠に欠けるとする見解もあって¹²⁾，統一されていなかったためと思われる。NORRIS ら⁸⁾の研究で，これらが同一属であることが確認されたので，著者はテトラセルミス属を採用することとした。

2. 生活史

(1) 生活環

テトラセルミス属の生活史については，既に多くの知見が報告されている^{9,13,14)}。それらによると，群体を形成する種と形成しない種的生活環はやや異なるが，テトラセルミスを含めて単細胞遊泳性種は，通常，図1の1→2→3→8→1のサイクルで増殖する。すなわち，増殖期には多くの遊走細胞が4本の鞭毛を下にして培養器の壁面に付着し，鞭毛を切断して不動細胞となり，不動細胞内では2個の娘細胞が形成される。娘細胞は，分裂直後は同じ向きに並列しているが，後に一方が180度回転して互いに異なる向きに並らぶ。2個の娘細胞は親の不動細胞外皮鞘を破って泳ぎ出す。細胞の増殖過程で，増殖率が小さくなる定常期以後では不動細胞が徐々に増加し，さらに放置すれば不動細胞内で娘細胞が形成されないまま細胞質が一方にかたより，外皮鞘が数層に重なった細胞が多くなる（図2）。

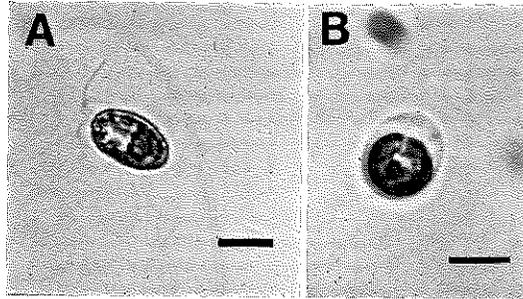


図2 テトラセルミス *T. tetrathele* の遊走細胞 (A) と細胞質が一方に片寄った不動細胞 (B)¹²⁾。縮尺は 10 μ m を示す。

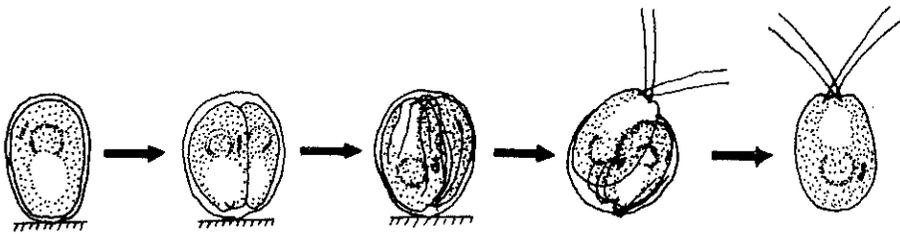


図3 不動細胞内での娘細胞の形成 (NORRIS *et al.* 1980)¹³⁾。

このような遊走細胞・不動細胞からなる生活環とは別に、テトラセルミス属の多くの種でシストの形成が報告されている^{13,14)}。シストは球形で一層の重い殻に被われることで容易に判別でき、シスト内では例外なく4個の娘細胞が作られる¹³⁾。TANOUÉ and ARUGA¹⁵⁾は、*Tetraselmis** sp. のシスト形成条件を調べ、定常期のまま6~8週間保ち続けたり、培養水のpHを9まで上昇させるとシストが形成されることを報告した。しかし、著者はテトラセルミスを定常期のまま3ヶ月以上放置したが、シストの形成は観察できなかった。また、シストは有性生殖の結果、形成されるのか、不動細胞がシストに変化するのか、今のところ十分な説明はなされていない。シストの形成条件の解明は生活史を知るうえで重要であるばかりでなく、元種の保存を行う場合にも有用であるので、今後の重要な課題であろう。

(2) 細胞分裂

分裂様式 細胞分裂は例外なく不動細胞内で起こる。遊走細胞が4本の鞭毛を切り離して不動細胞となった後、細胞質が外側からくびれ、ほぼ均等に二分割される。娘細胞は親の不動細胞内で既に鞭毛を具えており、不動細胞の外皮鞘の一部が破れて泳ぎ出す。これら一連の変化は図3に示す。また、MANTON and PARK¹⁵⁾は、*Tetraselmis** *tetrathele* の娘細胞が外皮鞘内で互いに向きを変えて並列する様子を電子顕微鏡を用いて観察している。

分裂の周期性 屋外水槽でテトラセルミスを培養した場合、細胞分裂は夕方から深夜にかけて起こる。日中には分裂中の細胞はまったく観察できない(図4)。ただし、実験的に一日中照明した場合、細胞分裂は常時観察できる。TANOUÉ and ARUGA¹⁵⁾は *Tetraselmis** sp. でこの周期性を証明し、同調培養を行っている。細胞分裂の周期性を知ることは、大量培養を行う場合、植継ぎ時刻や収穫時期を定めるために重要であろう¹⁶⁾。

* 原著には *Platymonas* の属名で書かれているが本論文では *Tetraselmis* を採用した。

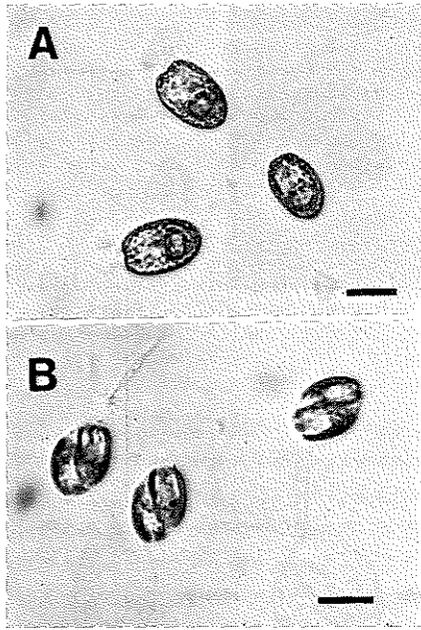


図 4 夜間における細胞の分裂。A: 午後 2 時に屋外水槽から採集したテトラセルミス, B: 午前 2 時に屋外水槽から採集したテトラセルミス。縮尺は $10\ \mu\text{m}$ を示す。

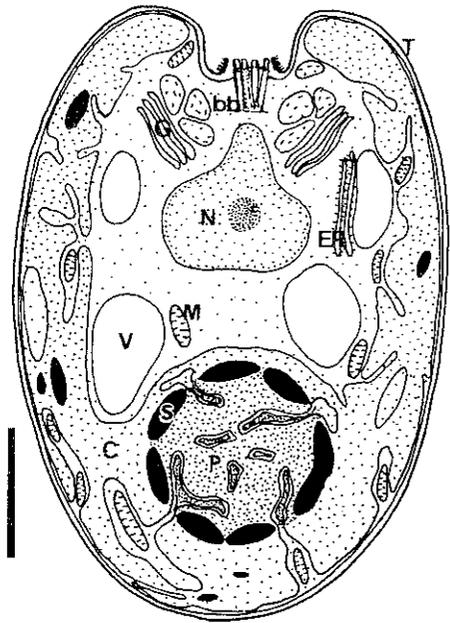


図 5 *Tetraselmis astigmatica* sp. nov. (Holo-type) の細胞縦断面略図。bb: 基底小体, C: 葉緑体, ER: 小胞体, G: ゴルジ体, M: ミトコンドリア, N: 核, P: ピレノイド基質, S: デンブン粒, T: 外皮鞘, V: 液胞, 縮尺は $3\ \mu\text{m}$ (HORI *et al.* 1982)⁹⁾。

3. 形態的特徴

(1) 遊走細胞の形態

テトラセルミスの遊走細胞は卵円形で長径 $9.8\sim 15.3\ \mu\text{m}$, 短径 $6.0\sim 10.5\ \mu\text{m}$, 厚さ $4.3\sim 8.5\ \mu\text{m}$ であり, 長さがほぼ等しい 4 本の鞭毛が細胞前端の窪みから突出している。細胞体積は約 $320\ \mu\text{m}^3$ でクロレラの 20~30 倍である¹⁷⁾ (図 2)。細胞の後端は側面から観るとねじれて斜めに曲がる。最近, 電子顕微鏡で観察した遊走細胞の構造が, 多くの論文に報告されているが, ここでは堀らによって描かれた *T. astigmatica* の細胞構造略図を示す (図 5)。ピレノイドの構造は *T. tetrathele* と異なるものの, その他は類似している。光学顕微鏡でも, 核, ピレノイド, 眼点, 葉緑体の分布はよく観察できる。

外国で餌料生物として広く利用されているテトラセルミス類は, *T. maculata*¹⁸⁾, *T. suecica*¹⁹⁾ である。テトラセルミス属の種の分類は電子顕微鏡による詳細な観察が必要であるが, *T. tetrathele* に比べて両種は小型で, 細胞の長径は $10\ \mu\text{m}$ 内外である。また, 眼点は細胞の後方に位置し, 側面から観て細胞はねじれて斜めに曲がらないこと⁶⁾ などから, 区別できる。

(2) 不動細胞の形態

テトラセルミスの不動細胞は卵円形で, 大きさは遊走細胞と大差ないが, やや球形に近い。細胞の後端は斜めに曲がらず, 数層に重なる外皮鞘でつまれ, 鞭毛は無い。堀・千原²⁰⁾の報告によると, 不動細胞は外皮鞘で完全に包まれており, 鞭毛の突出する穴も閉ざされている。細胞の内部では 2 個の娘細胞が形成されている場合や, 鮮やかな緑色の細胞質が一方に片寄っている場合がある。パッチ式で培養を行った場合, 個体群の減衰期に多くの不動細胞が餅状に培養器底部に溜まる。

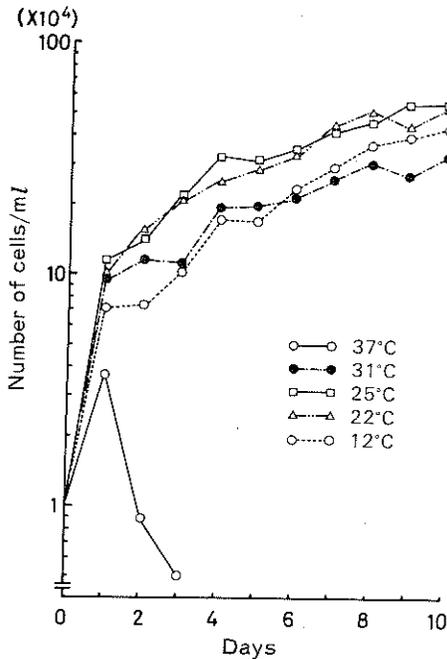


図 6 異なる水温で培養したテトラセルミスの増殖 (岡内・福所 1984)¹⁷⁾。

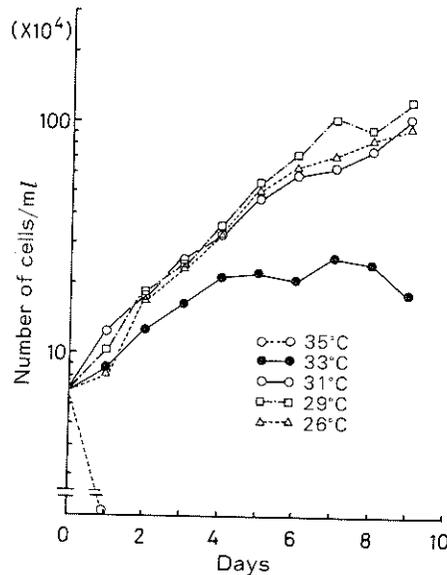


図 7 高水温条件下で培養したテトラセルミスの増殖 (岡内・福所 1984)¹⁷⁾。

4. 生態

谷本・堀²¹⁾の報告では、テトラセルミス属の生育の最盛期は 12~3 月で、淡水が混入するタイドプールで良く繁殖する。種名は明らかではないが、テトラセルミス属は日本沿岸 (特に太平洋岸) から多く採集されている。その分布は北海道から沖縄県まで広がっている。また、ブラジル沿岸からも数種のテトラセルミス属が分離されており、世界各地に広く分布すると思われる。

テトラセルミス属に限らず多くのブラシノ藻類は河口域あるいはタイドプールで繁殖する²¹⁾。このことからテトラセルミスは広範囲の塩分条件下で増殖し、屋外池でも培養できる微小藻類であることが想像できる。ところが、ブラシノ藻類は赤潮を形成する鞭毛藻のひとつにあげられている²²⁾。事実、1985 年 5 月末、熊野灘一帯にブラシノ藻類による赤潮が発生した。しかし、短期間で終わり、漁業上の被害はなかった。過去の記録にも、ブラシノ藻類による赤潮で被害が出た例はない。

本論文で対象とするテトラセルミスは、施肥しない海水中での繁殖率は低い。そのため、大量培養槽から流出しても問題はないと思われる。

5. 増殖特性

(1) 水温

テトラセルミスは 12°C~31°C の水温範囲で良く増殖する (図 6)。特に、26°C~31°C での増殖は速く (図 7)、この傾向は 10°C と 20°C で保存した元種を用いて、その増殖率を比較しても大差はない (図 8)。これらのことから、元種の保存温度にかかわらずテトラセルミスの至適増殖水温はクロレラ等比べて高いことがわかる。一方、テトラセルミスは 10°C 以下の条件で培養すると、増殖率は低い、20 日間の培養で 1×10^4 細胞/ml から 5×10^5 細胞/ml まで増殖することから、テトラセルミスは広温耐性種であり、屋外での培養が周年可能で、北方域でも大量培養できると思われる¹⁷⁾。

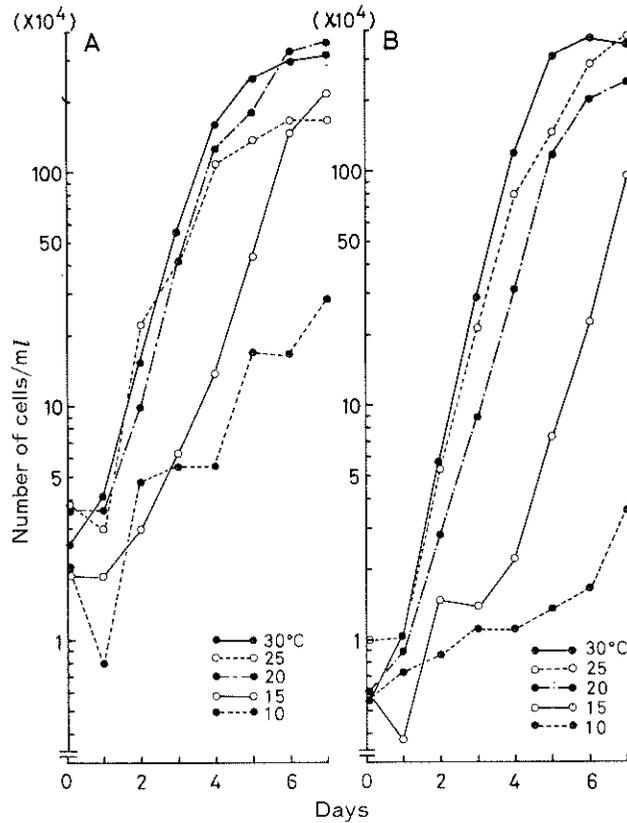


図 8 異なる温度条件 (A: 10°C, B: 20°C) で保存したテトラセルミスの各水温条件下での増殖。

テトラセルミス属の他種を用いた実験で, YANASE and IMAI²³⁾ は *Tetraselmis** sp. の至適増殖水温を 23°C~25°C と報告し, LAING and HELM²⁴⁾ は *T. suecica* で 18°C~22°C, TANOUÉ and ARUGA¹³⁾ は *Tetraselmis** sp. で 20°C~24°C としている。これらの種と比較しても今回使用したテトラセルミスは高温耐性種であると言える。

(2) 塩 分

テトラセルミスは広塩耐性種¹⁷⁾, 稀釈および濃縮海水を用いた実験では塩分 10‰~53‰ の範囲で増殖することがわかっている (図9, 10)。このことから飼育対象生物の適正塩分で本種を培養すれば, 給餌の際, 塩分調整作業なしに給餌できる。*Tetraselmis* sp. は 5‰~35‰²⁵⁾ あるいは 2.3~47.5‰¹³⁾ で良く増殖することが報告されており, テトラセルミス属は一般に広い塩分条件下で良く増殖すると思われる。

III. 大量培養法

1. 培養法の類別

テトラセルミスの培養法は, 基本的にはバッチ式植継ぎ法である。植継ぎは常に小容量の培養器で増殖させたテトラセルミスを用意種として, より大容量の培養液に接種することを原則とする。実際の植継ぎ手順は次の通りである。単種分離→液体または寒天培地による継代保存培養→培養室での小規模培養→培養室での

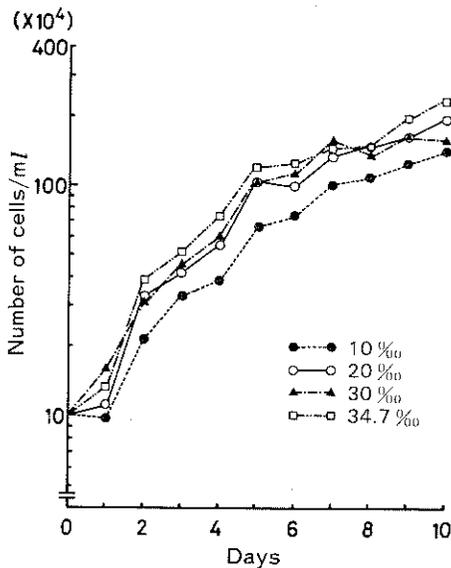


図9 異なる塩分の稀釈海水および天然海水中でのテトラセルミスの増殖。

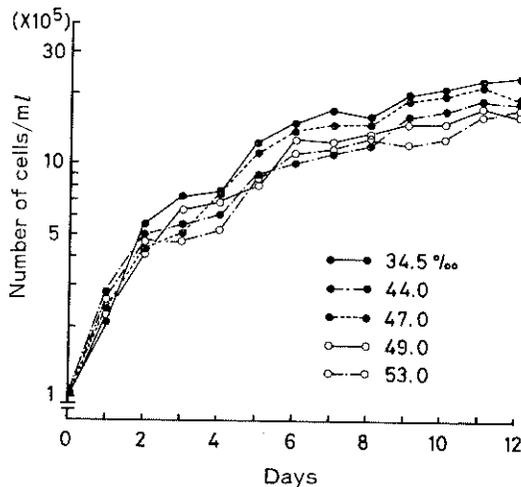


図10 異なる塩分の濃縮海水および天然海水中でのテトラセルミスの増殖。

中規模培養→屋外での大量培養。なお、便宜上、ここでは培養方法をその規模により次のように分類する。
 小規模培養：0.5 l~3.0 lの培養器（平底フラスコ）を用いた単種培養，中規模培養：10 l~30 lの培養器（培養瓶あるいはポリカーボネイト円型水槽）を用いた単種培養，大量培養：0.5 t以上の屋外設置水槽を用いた単種培養。

2. 分離

テトラセルミスの単種分離は、シュライバー氏液²⁶⁾で作製した1.5%寒天培地にテトラセルミス混液を塗布してコロニーを作らせ、特に独立したコロニーから白金線を用いて分離する手法で行う。テトラセルミスのコロニーは鮮やかな緑色で、比較的早い時期に大きく形成されるため、他の藻類と区別しやすい。著者の方法では、細胞密度が約5万細胞/mlの培養液を塗布すると、20°C・3,000 Lux・蛍光灯による連続照明条件下で、約10日後に鮮やかな緑色のコロニーが観察される。また、ピベット法²⁷⁾でも分離できる。この場合、遊走細胞の採集は困難であるが、不動細胞の採集は容易で、特に分裂中の細胞を選べば増殖が早い。分離はクリーンベンチ内で行う。しかし、無菌分離を望まないなら、その必要はない。

3. 小規模培養

元種には試験管で保存培養中のテトラセルミスを使う。培養は25°C~30°C, 3,000 Lux~4,000 Lux・連続照明で通気して行う。清浄な空気を供給するため、通気は底に水を張った戸過瓶を利用し、コンプレッサーから送られた空気は必ず一度は水に通してから、各培養器に送る方法で行う。また、培養液や培養器はオートクレーブで滅菌する。計画的に培養するためには、合成培養液を使用することが望ましいが、試薬による栄養添加海水を代用しても良い。ただし、小規模な培養を行う場合、栄養塩添加量が少量でよいので、不純物の影響が大きくかつ溶けにくい肥料添加培養液の使用は避けるべきであろう。テトラセルミスの培養に適した合成培地は、ASP液²⁸⁾、ASP₁₂(NTA)液²⁶⁾、TANOUÉ and ARUGA¹⁸⁾によって改変されたASP液などである。また、栄養添加海水はシュライバー氏液²⁶⁾が適当であろう。今後、さらにテトラセルミスの増殖に適した、処法の簡単な培養液の検討が望まれる。また、培養期間は約1週間から10日で定常期に達する。その時の細胞密度は約100万~200万細胞/mlで、細胞はニラに似た鮮やかな緑色である。

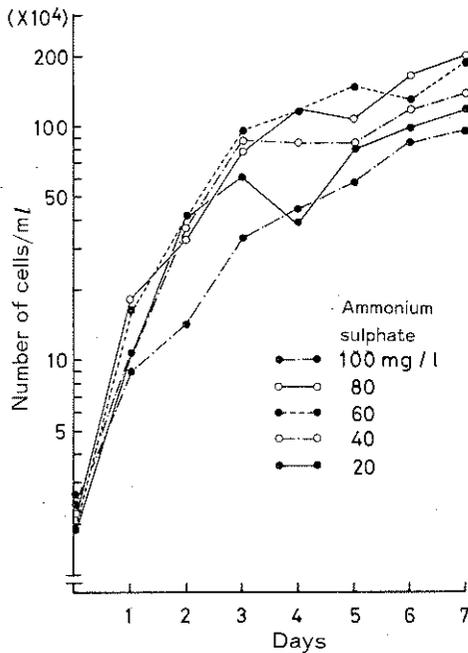


図 11 硫酸添加量が異なる施肥培養液でのテトラセルミスの増殖 (各培養液には過磷酸石灰: 20 mg/l, クレワット 32: 4 mg/l を添加した)。

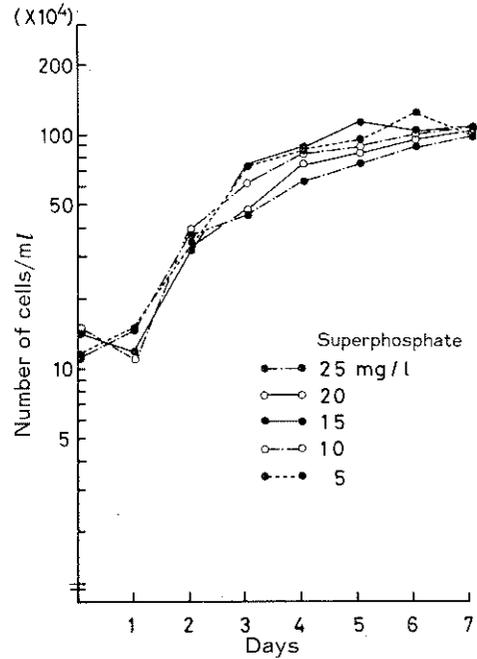


図 12 過磷酸石灰添加量が異なる施肥培養液でのテトラセルミスの増殖 (各培養液には硫酸: 80 mg/l, クレワット 32: 4 mg/l を添加した)。

4. 中規模培養

元種は小規模培養で培養したものである。培養条件、培養法は小規模培養と同じである。培養液は、オートクレーブで滅菌した海水か、または紫外線とオゾンで滅菌した海水を用いて作る。栄養塩には試薬または肥料のいずれを使用しても大差はない。接種時の細胞密度を1万~10万細胞/mlとすると、個体群は約1週間後に定常期に達するので、培養期間は1週間としてよい。

5. 大量培養

(1) 施肥処法

屋外水槽を用いたテトラセルミスの大量培養には肥料添加海水を使用する。施肥処法はクロレラ培養に使用されている処法がそのまま適用できるが¹⁷⁾、さらにテトラセルミスに適した処法も検討した。肥料は、硫酸、過磷酸石灰、クレワット 32 (帝国化学株式会社)、尿素を使用するとして、硫酸は60~80 mg/l、過磷酸石灰は5~15 mg/l、クレワット 32は4 mg/l 添加すればよい (図 11, 12, 13)。尿素は、硫酸添加量を60 mg/l または 40 mg/l として、各々 9.1 mg/l, 18.3 mg/l を添加した場合にやや効果があったものの (図 14)、硫酸添加量が 80 mg/l では効果はみられなかった (図 15)。これらのことから、前記3種類の肥料を用いる場合は硫酸: 80 mg/l、過磷酸石灰: 15 mg/l、クレワット 32: 4 mg/l が最適であるが、窒素源として尿素も使用するとさらに安価な大量培養が可能で、最適処法は硫酸: 60 mg/l、過磷酸石灰: 15 mg/l、クレワット 32: 4 mg/l、尿素: 9.1 mg/l である。

(2) 捕食動物の駆除

テトラセルミスの大量培養槽に繁殖する捕食動物は主に原生動物とワムシである。特に多膜綱下毛目に属する繊毛虫とワムシによる捕食が多い。それらに対する対策として、クロレラでは塩素剤の添加が広く行わ

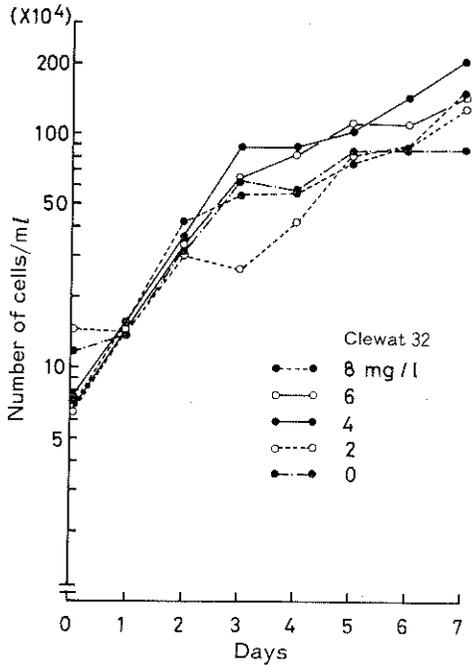


図 13 クレワット 32 の添加量が異なる施肥培養液でのテトラセルミスの増殖 (各培養液には硫酸: 80 mg/l, 過磷酸石灰: 15 mg/l を添加した)。

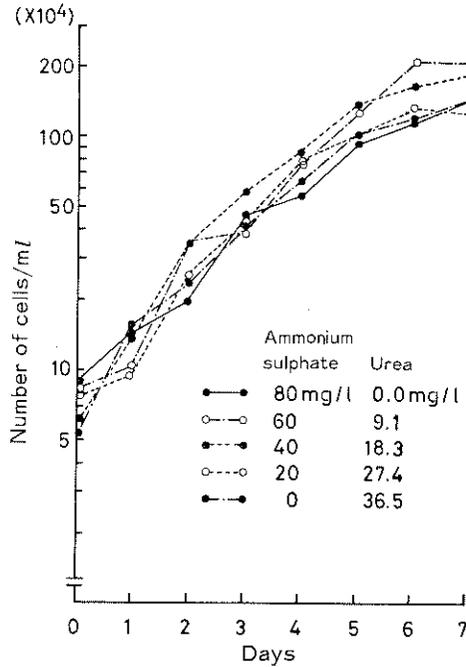


図 14 硫酸と尿素添加量が異なる施肥培養液でのテトラセルミスの増殖 (各培養液には過磷酸石灰: 15 mg/l, クレワット 32: 4 mg/l を添加した)。

れている。テトラセルミスの場合も、実験的に塩素が有効であるとされているが、実用例は報告されていない。貝類の種苗生産過程で発生する微生物や織毛虫の駆除には PVP-Iodine²⁹⁾、過酸化水素水³⁰⁾、マラカイトグリーン³¹⁾が有効であると報告されているので、今後はテトラセルミスの屋外培養でも検討する必要がある。また、著者は培養槽へのワムシ混入の対策として、テトラセルミスを高塩分条件で大量培養することを検討している。テトラセルミスが広い塩分耐性を持つことは述べたが、培養液に食塩を加えて培養した場合、塩分が 50% を超えてもテトラセルミスは増殖する (図 16)。一方、ワムシは高塩分条件で増殖力が低下するので³²⁾、仮りにワムシが混入してもあまり増殖しないと思われる。

(3) 好適培養法

テトラセルミスの大量培養は屋外に設けた透明ポリカーボネイト水槽や FRP 水槽を用いて行っている。培養槽はできるだけ日当たりの良い場所に設置する。培養水は天然海水を砂濾過し、塩素で殺菌後、曝気したものを使用する。テトラセルミスはクロレラと比べて細胞体積が大きいので定常期の細胞密度は低く、また定常期は短い。増殖率は夏季に高いが、接種後数日で約 35 万細胞/ml に達し、増殖が止まる (図 17)。逆ラセルミに、冬季には増殖率は低い、徐々に増殖し、約 70 万細胞/ml に達する (図 18)。これらのことからテトスの培養は、100 t 以上の大型水槽を用いた間引き法よりも 0.5~30 t の小型水槽を多数用いた植継ぎ法が適する。そして、植継ぎの間隔は夏季には短く、冬季には長くする必要があると思われる。

IV. 元種の保存

著者は試験管 (20×125 mm のねじ口試験管) を用いて寒天斜面培地法と液体静置培養法²⁷⁾ を併用して保存している。さらに、少ない労力で長期間安全に保存するために、試験的に 2 相培地法、冷蔵保存法、凍結

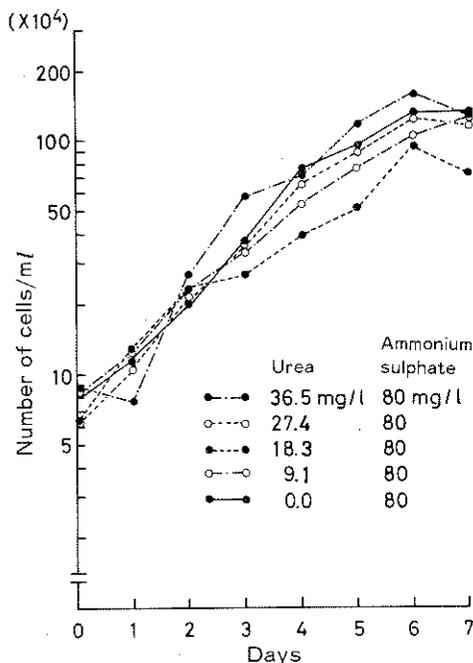


図 15 尿素添加量が異なる施肥培養液中でのテトラセルミスの増殖 (各培養液には硫酸: 80 mg/l, 過磷酸石灰: 15 mg/l, クレワット 32: 4 mg/l を添加した)。

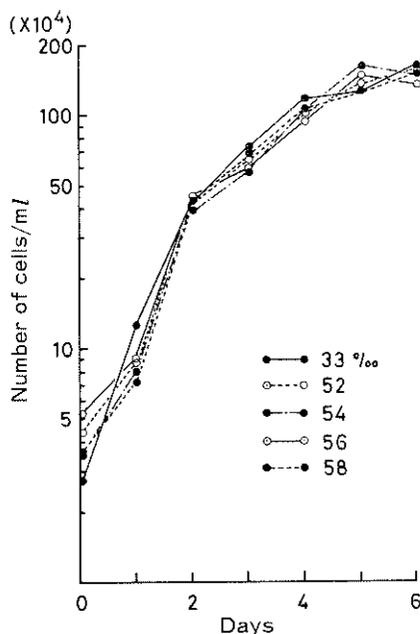


図 16 食塩添加により塩分を替えた培養液中でのテトラセルミスの増殖。

保存法も検討している。

1. 継代培養保存法

(1) 寒天斜面培地法および液体静置培養法

培養液には合成培養液 (ASP 液等) または冷蔵所貯蔵海水を用いた栄養添加海水 (シュライバー氏液等) を使う。寒天斜面培地は培養液に 1.5% の寒天を溶かして作る。他の藻類や捕食動物の混入を防ぐために、培養液や培養器はオートクレーブで滅菌する必要がある。しかし、一方では鞭毛性緑藻を無菌状態で合成培地を用いて培養すると、藻の代謝産物の影響によって急に枯死することが他の種で報告されている³²⁾ので、無菌で保存する必要はないと思われる。保存条件は、テトラセルミスを接種した後、増殖が確認されるまでは 25°C~30°C, 3,000 Lux~4,000 Lux とする。その後、10°C~20°C, 500 Lux~1,000 Lux の条件で保存する。新しい培養液への植継ぎは、液体培養法では 3ヶ月ごとに行う必要があるが、寒天斜面培地法では完全密封できていたら、6ヶ月間植継ぎなしに保存できることが確かめられている。しかし、保存中に寒天の結晶水が蒸発し、コロニーが乾燥してしまう場合があるので注意を要する。

(2) 寒天・液体 2 相培地法

液体静置培養法は、細胞の動きや色でその生死が判別できるが、植継ぎを頻繁に行う必要がある。寒天斜面培地法は植継ぎ間隔は長い、密栓をしていなければ乾燥し、また細胞の活力を判別することがややむずかしい。そこで、栄養塩類が長期間に徐々に溶け出す寒天培地の利点³⁴⁾と細胞の活力が判別し易く、乾燥で死滅する心配のない液体培地の利点を組み合わせた寒天・液体 2 相培地法での保存を試験している。この培地は、栄養塩類を含ませた 1.5% 寒天 5 ml を試験管の下部で固ませた後、10 ml の液体培地を加え、液体と寒天の重層を作る。分離したテトラセルミスを液層部に接種し、増殖させる。現在、この方法で 6ヶ月

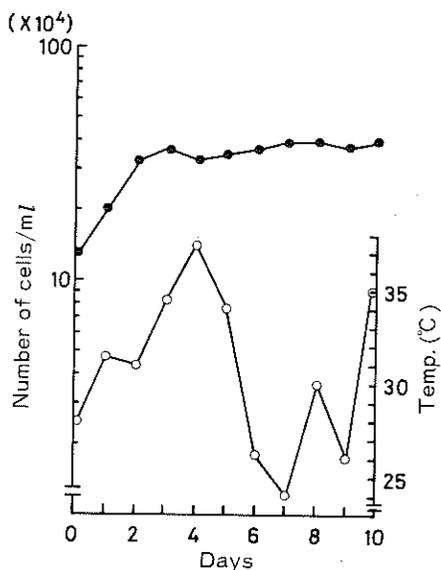


図 17 夏季における屋外水槽でのテトラセルミスの増殖。●：テトラセルミスの細胞密度，○：午後 2～3 時の水温 (岡内・福所 1984)¹⁷⁾。

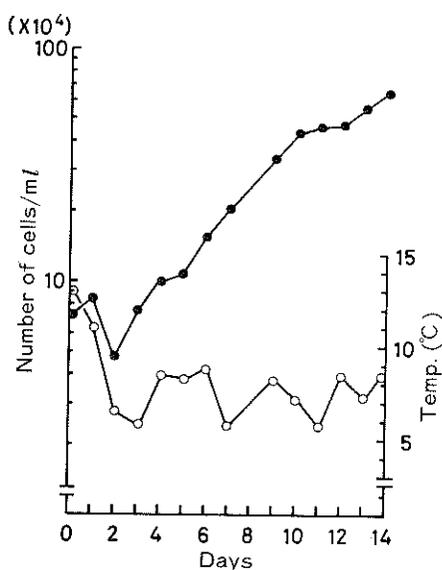


図 18 冬季における屋外水槽でのテトラセルミスの増殖。●：テトラセルミスの細胞密度，○：午前 9～10 時の水温 (岡内・福所 1984)¹⁷⁾。

間植継ぎなしに保存できることが確かめられた。その他の方法として、市村は³²⁾風乾した土壌を数グラム入れて滅菌した土壌・液体 2 相培地が微小藻類の保存に有効であると報告している。今後、テトラセルミスでも試験する必要があるだろう。

2. 不動細胞を利用した冷蔵保存法の検討

微小藻類の大量培養を計画的に行うには、元種の量が多いほうが好ましい。特に、テトラセルミスの大量培養はクロレラに比べて植継ぎ間隔の短い培養法を採用するため、中規模培養で増殖させた後、冷蔵庫に保存し、必要に応じて屋外大量培養槽に接種できれば、より安定した大量培養が可能になる。そこで中規模培養 (25°C, 4,000 Lux・連続照明) で増殖させたテトラセルミスを、0～2°C の冷蔵庫に保存した後、増殖力の変化を調査した。保存中は菌の繁殖を防ぐため、1 ヶ月ごとに上澄みを滅菌海水と交換する。この試験では 2 ヶ月間保存したテトラセルミスは保存せずに接種した場合と同様に増殖したものの、6 ヶ月間保存した場合、死細胞が増加した (図 19)。このことから、大量培養の元種は約 2 ヶ月間は冷蔵庫に備蓄することが可能と思われるが、今後実用化にむけて試験する必要があるだろう。また、保存中、細胞はすべて不動細胞に変化し、保存期間が長くなるにつれ外皮鞘は厚く重なる。これは保存中の低水温または培地の変質に対する適応と考えられる。なお、梅林は³⁵⁾餌料生物として使用される珪藻 5 種を家庭用冷蔵庫内に保存し、*Skeletonema costatum*, *Cyclotella nana*, *Chaetoceros calcitrans* は 9 ヶ月、*Phaeodactylum tricornerutum* は 25 ヶ月、*Nitzschia closterium* は 34 ヶ月保存できたことを報告している。この方法は多種の元種保存に利用できるとと思われる。

V. テトラセルミスによるワムシの培養

1. ワムシに対する餌料価値

テトラセルミスの L 型ワムシに対する餌料価値は、バッチ式培養法と個別飼育法で調べられている。L

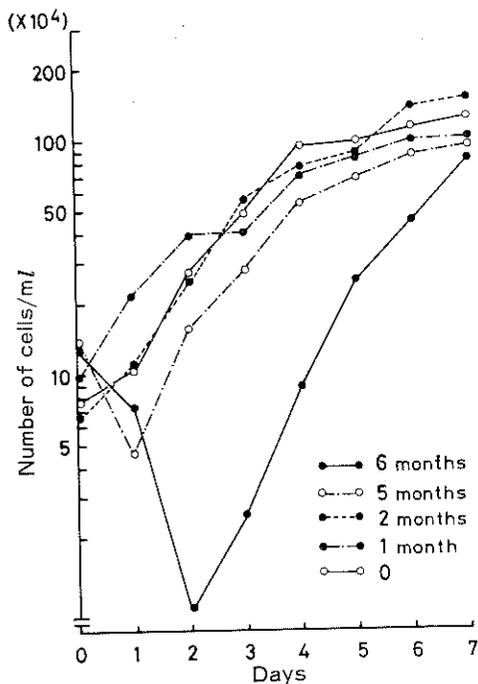


図 19 異なる期間冷蔵保存したテトラセルミスの増殖。

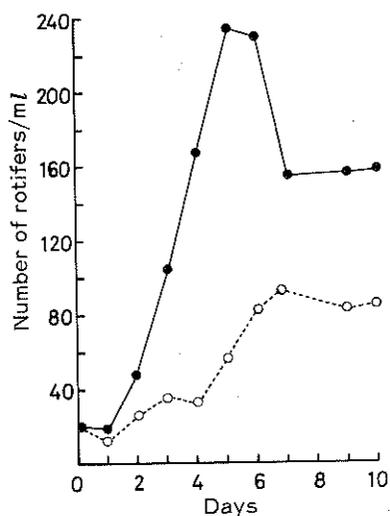


図 20 予備培養と同種の餌料藻を与えたL型ワムシの増殖。●: テトラセルミス給餌区, ○: クロレラ給餌区 (岡内・福所 1984)³⁶⁾。

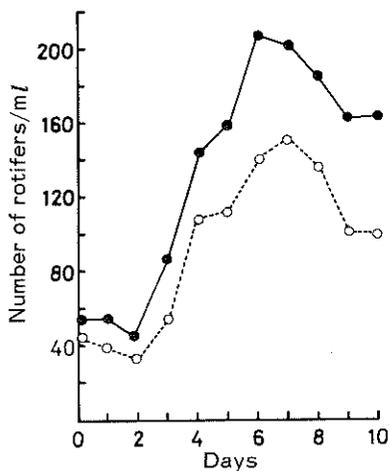


図 21 クロレラで予備培養後、テトラセルミスまたはクロレラを給餌したL型ワムシの増殖。●: テトラセルミス給餌区, ○: クロレラ給餌区 (岡内・福所 1984)³⁶⁾。

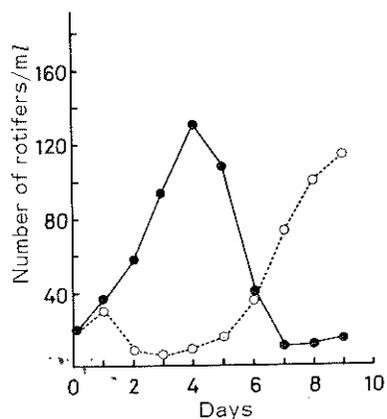


図 22 テトラセルミスで予備培養後、テトラセルミスまたはクロレラを給餌したL型ワムシの増殖。●: テトラセルミス給餌区, ○: クロレラ給餌区 (岡内・福所 1984)³⁶⁾。

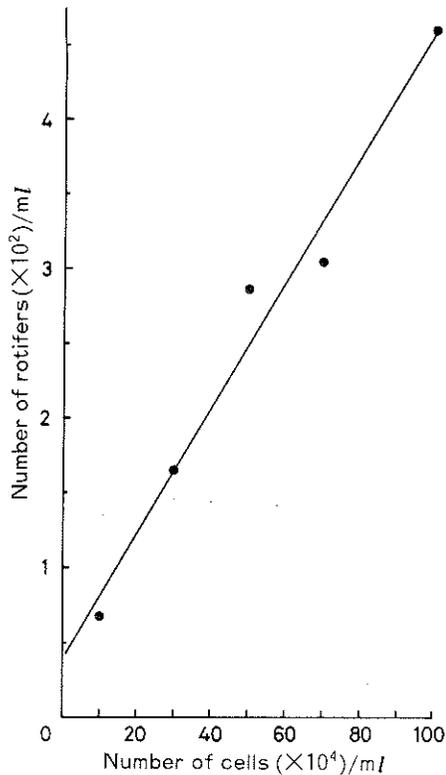


図 23 テトラセルミスの日間給餌密度とL型ワムシの最高増殖密度との関係 (岡内・福所 1983)³⁹⁾。

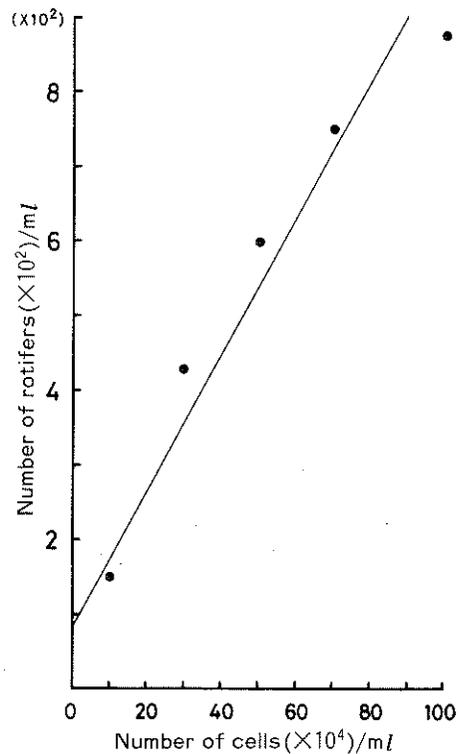


図 24 テトラセルミスの日間給餌密度とS型ワムシの最高増殖密度との関係 (岡内ら 1984)⁴⁰⁾。

型ワムシの個体密度と増殖率は摂餌前歴によらずテトラセルミス給餌区がクロレラ給餌区に優る³⁶⁾ (図 20, 21, 22)。また、ワムシの代謝産物や餌料密度変化の影響を考慮した個別飼育法でも、内的自然増加率と純繁殖率はクロレラ給餌ワムシに比べてテトラセルミス給餌ワムシで高い³⁷⁾。既に、HIRAYAMA et al³⁸⁾ は7種類の海産微小藻類の餌料価値をクロレラと比較し、クロレラが最も餌料価値が高いことを報告している。このことからテトラセルミスの餌料価値は高く評価できる。

2. 好適給餌密度

間引き法によるワムシの大量培養の際、テトラセルミスを効率的に使うためには、ワムシ密度に対応した適切な給餌密度を知る必要がある。そこで、テトラセルミスの好適給餌密度を求めるために、密度が6段階に異なる餌料浮遊培養液に一定数のワムシを収容し、毎日、同じ密度の餌料を含んだ新しい培養液中に植え継ぐ方法で10日間培養した。その結果、テトラセルミス給餌密度 (X , 10^4 細胞/ml) と実験期間中のワムシ密度の最大値 (Y , 個体/ml) との間には、L型ワムシでは $Y=4.21X+38.68$, S型ワムシでは $Y=9.27X+81.67$ の比例関係がみられた (図 23, 24)。これらの関係式から、1日1回テトラセルミスを給餌すると仮定して、一定の給餌密度で増殖するワムシの密度が推定できる^{39,40)}。

3. ワムシの大型化

ワムシの大きさは、異なる餌料を給餌した場合に変化することが報告されている⁴¹⁾。一般に、微小藻類を給餌すると酵母類の給餌に比べてワムシは大型化する¹⁾。酵母類では、パン酵母より油脂酵母で培養した方が背甲長、重量ともに大きくなる^{42),43)}。微小藻類では *Schizothrix* sp. を給餌するとワムシは大型化する⁴⁴⁾。

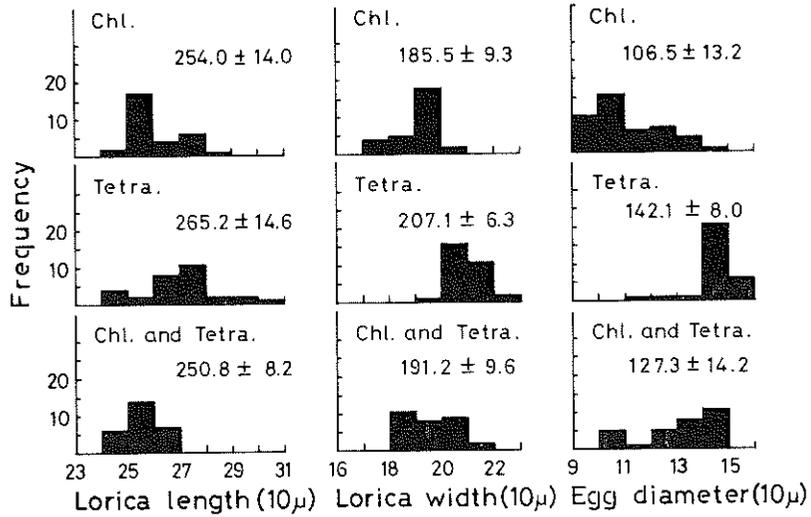


図 25 クロレラ (*Chl.*), テトラセルミス (*Tetra.*), 両種併用 (*Chl. and Tetra.*) で培養した複相単性生殖卵携帯 L 型ワムシの大きさの差異。図中に平均値と標準偏差を示す (福所ら 1984)⁴⁰⁾。

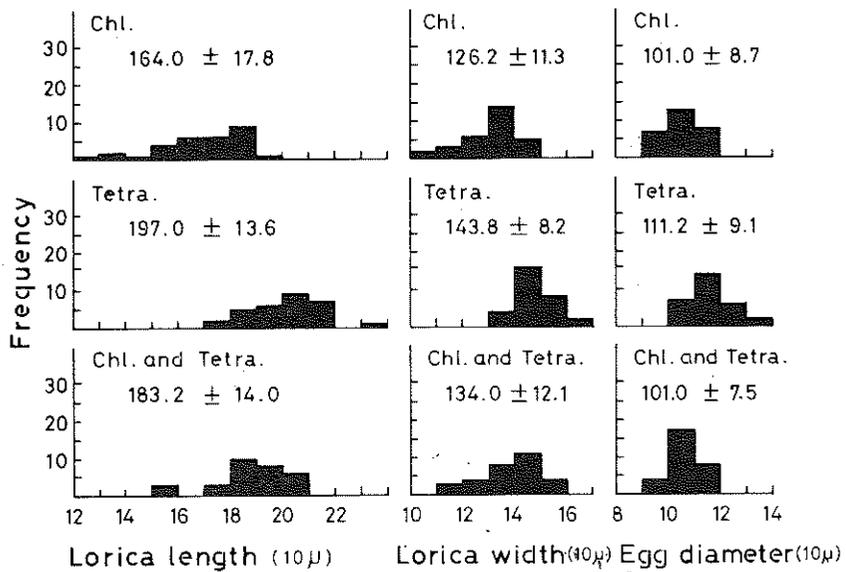


図 26 図 25 と同様な餌料藻で培養した複相単性生殖卵携帯 S 型ワムシの大きさの差異。図中に平均値と標準偏差を示す。

また、同属の藻類でも *Nannochloris oculata* と *N. maculata* では、後者を与えたほうが大型化する⁴⁵⁾。屋外培養槽で大量培養したテトラセルミス給餌ワムシ、テトラセルミス・クロレラ併用給餌ワムシ、クロレラ給餌ワムシの単為発生卵携帯雌虫で背甲長、最大甲幅、卵径を比較すると、L 型・S 型ともにテトラセルミスを給餌した区が大型化することがわかった (図 25, 26)。その原因として、餌料の大型化に伴う適応ま

たは良質な餌料の摂餌による成長促進が考えられる。大型化の傾向は、10日間の培養期間中も維持し続けられるので(図27)、テトラセルミス給餌により大型のワムシを生産できると考えられる。大型化したL型ワムシは、全長6mm以上の仔魚用餌料として効果的であろう。

VI. テトラセルミスの化学成分

テトラセルミスの化学成分をクロレラと比較すると、タンパク質含量はクロレラより多いが、脂質含量は少ない傾向がみられる^{46,47)}。脂質中の高度不飽和酸(ω 3HUFA)は、クロレラの約1/2量である⁴⁶⁾。なお、テトラセルミスの脂肪酸組成の特徴は、リノレン酸(18:3 ω 3)が高い濃度で含まれている(約24%)ことである^{46,47)}。PARSONS *et al.*⁴⁸⁾は *T. maculata* のタンパク質、炭水化物、脂質の細胞乾燥重量当りの割合を報告しているが餌料生物として広く使用されている他の海産微小藻類と比べてもタンパク質含量が高く、脂質含量は低い傾向がある。また、*T. suecica* は高塩分条件で培養すると総タンパク質および細胞当りのタンパク質含量は増加する。さらに、塩分20‰以上では、培養液中の硝酸ナトリウムの量が増加するとタンパク質含量が増えることが報告されている⁴⁹⁾。テトラセルミスも硝酸ナトリウムを栄養塩として良く増殖し、しかも前述のとおり高塩分条件でも増殖するので、この方法はタンパク質含量の高いテトラセルミスを培養するために有効な方法と思われる。また、クロレラでは培養時の水温により、細胞中のエイコサペンタエン酸含量が変化することが報告されており⁵⁰⁾、今後、異なる培養条件でのテトラセルミスの化学成分の変化も検討する必要がある。

VII. テトラセルミスで培養したワムシの餌料価値

テトラセルミスで培養したワムシの餌料価値は、クロレラで培養したワムシとの化学成分の比較および海産仔稚魚の飼育実験で検討した。ここでは、テトラセルミスで培養したワムシをテトラセルミスワムシ、テトラセルミスとクロレラを体積比が等しくなるように併用給餌して培養したワムシを併用ワムシ、テトラセルミスワムシをクロレラで二次培養したワムシを二次培養ワムシ、クロレラで培養したワムシをクロレラワムシとする。表1は、各々の餌料で培養したL型ワムシの一般分析値を⁴⁷⁾、表2と表3は各々の餌料で培養したL型とS型ワムシの脂肪酸組成を示す^{47,51)}。

1. 異なる餌料で培養したワムシの化学成分

(1) テトラセルミスワムシ

L型およびS型のテトラセルミスワムシは、クロレラワムシに比べてタンパク質含量が高く、 ω 3高度不飽和酸含量($\Sigma\omega$ 3HUFA)はクロレラワムシの1/2~1/3で、リノレン酸含量が高い。また、S型テトラセルミスワムシはL型テトラセルミスワムシに比べて脂質含量が低く、L型では2.5~3.9%含まれるのに対し、S型では1.9%であった。そのため、S型の体成分中の ω 3HUFAの量は約0.21%となり、海産の

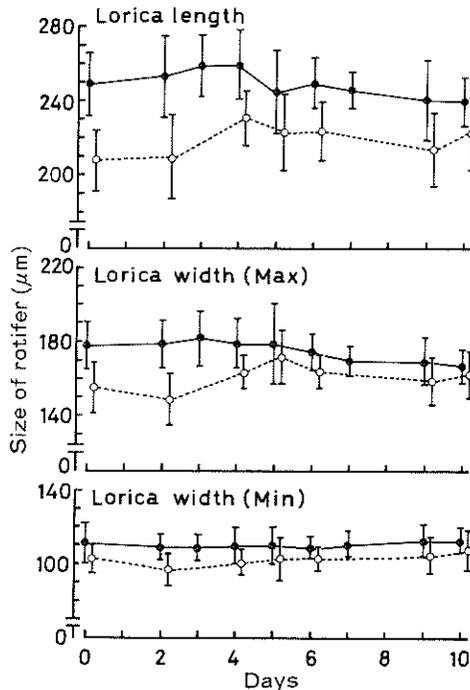


図27 10日間の培養期間における複相単性生殖卵携帯L型ワムシの大きさの変化。
●: テトラセルミス給餌区, ○: クロレラ給餌区。縦線は測定した30尾の標準偏差を示す。

表 1 異なる餌料で培養したL型ワムシの一般組成 (福所ら 1984)⁴⁷⁾

餌料	餌料				
	クロレラ	テトラセルミス	テトラ*セルミス クロレラ	テトラ**セルミス クロレラ (12)	テトラ***セルミス クロレラ (24)
水分 (%)	91.5	91.0	91.3	93.5	91.6
粗タンパク質 (%)	6.3	7.4	7.2	5.6	6.5
粗脂肪 (%)	2.4	2.5	2.5	2.4	2.6
粗灰分 (%)	0.6	0.5	0.4	0.4	0.6

* テトラセルミスとクロレラを併用給餌したワムシ。

** テトラセルミスで培養した後、クロレラで 12 時間二次培養したワムシ。

*** テトラセルミスで培養した後、クロレラで 24 時間二次培養したワムシ。

表 2 異なる餌料で培養したL型ワムシの脂肪酸組成 (福所ら 1984)⁴⁷⁾

脂肪酸	餌料				
	クロレラ	テトラセルミス	テトラ*セルミス クロレラ	テトラ**セルミス クロレラ (12)	テトラ***セルミス クロレラ (24)
14:0	5.5	3.1	5.3	5.1	5.8
16:0	16.2	15.6	16.4	15.5	15.2
16:1	18.8	5.2	14.6	11.1	15.2
16:4 ω 3	—	1.8	0.5	1.2	0.6
18	2.6	2.6	3.2	2.4	2.1
18:1	10.5	12.9	10.9	10.4	8.4
18:2 ω 6	4.7	6.5	5.6	5.4	4.4
18:3 ω 6	0.4	0.1	0.2	0.2	0.5
18:3 ω 3	0.2	22.4	9.9	15.0	9.7
18:4 ω 3	0.1	2.6	0.9	1.5	0.9
20:1	2.7	4.7	2.8	2.7	2.0
20:2 ω 9	0.3	0.1	0.2	0.2	0.2
20:2 ω 6	0.3	0.1	0.2	0.1	0.1
20:3 ω 6	1.1	0.2	0.6	0.3	0.4
20:4 ω 6	4.7	2.4	3.6	2.8	3.2
20:4 ω 3	0.5	5.7	3.6	4.6	3.2
20:5 ω 3	17.9	5.8	14.3	14.4	20.3
22:1	1.2	2.0	—	—	—
22:3 ω 6	0.5	0.1	0.3	—	0.1
22:5 ω 6	—	0.1	0.1	—	0.1
22:5 ω 3	5.2	0.7	2.6	1.2	1.6
22:6 ω 3	0.3	0.2	0.4	0.2	0.3
24:1	0.3	0.2	—	—	—
$\Sigma\omega$ 6	11.7	9.5	10.6	8.8	8.8
$\Sigma\omega$ 3	24.2	37.4	31.7	36.9	36.0
$\Sigma\omega$ 3HUFA	23.9	12.4	20.9	20.4	25.4

*, **, *** 表 1 と同じ。

仔稚魚用餌料として必要な量 (ワムシ中に 0.3~0.5%⁴⁶⁾) に満たない。そのため、S 型テトラセルミスワムシは給餌前にクロレラで二次培養する必要がある⁴⁷⁾。

(2) 併用ワムシ

L 型および S 型の併用ワムシに含まれる $\Sigma\omega$ 3HUFA はテトラセルミスワムシとクロレラワムシのほぼ中

表 3 異なる餌料で培養したS型ワムシの脂肪酸組成 (福所ら 1985)⁵¹⁾

脂 肪 酸	餌 料					クロレラ
	テトラセルミス	テトラセルミス クロレラ	テトラセルミス クロレラ (12)	テトラセルミス クロレラ (18)	テトラセルミス クロレラ (24)	
14:0	2.7	4.3	2.8	3.2	3.5	5.8
15:0	0.7	0.5	0.6	0.6	0.6	0.5
16:0	17.3	15.5	16.6	18.2	16.5	17.7
16:1	3.7	14.5	6.7	7.7	10.8	16.6
16:2	0.8	0.4	0.6	0.7	0.7	0.2
16:3	0.8	0.5	0.6	0.7	0.7	0.2
16:4	2.6	0.5	0.7	0.6	1.1	0.5
18:0	3.1	2.6	3.1	2.9	3.1	2.4
18:1	13.8	15.0	11.8	13.3	11.5	13.2
18:2 ω 6	9.2	5.4	6.6	7.3	6.5	5.2
18:3 ω 6	0.3	0.4	0.3	0.2	0.5	0.2
18:3 ω 3	19.8	4.5	19.0	15.8	10.3	0.5
18:4 ω 3	2.2	0.7	2.3	1.7	0.9	0.2
20:1	4.2	3.5	4.3	3.6	3.7	2.6
20:2	0.3	0.8	0.2	0.2	0.4	0.3
20:3 ω 6	0.3	0.6	0.3	0.3	0.6	0.9
20:4 ω 6	2.1	4.0	2.8	2.6	3.7	4.7
20:4 ω 3	4.5	1.9	4.4	3.9	3.6	0.4
20:5 ω 3	5.9	14.9	8.0	8.8	14.0	16.5
22:1	1.1	1.8	1.3	1.1	1.2	1.2
22:4 ω 9	0.5	tr	0.4	0.4	0.3	tr
22:4 ω 6	0.1	0.5	0.2	0.1	0.3	0.7
22:5 ω 6	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
22:5 ω 3	0.7	3.1	0.9	0.8	1.7	5.8
22:6 ω 3	tr	0.1	tr	0.1	tr	0.2
24:1	0.5	0.4	0.6	0.4	0.5	0.3
$\Sigma\omega$ 6	12.1	11.0	10.3	10.6	11.7	11.8
$\Sigma\omega$ 3	11.1	20.0	13.0	13.6	19.3	23.6
$\Sigma\omega$ 3HUFA	11.1	20.0	13.0	13.6	19.3	22.9
Lipd (%)	1.9	3.8	3.6	3.7	3.4	3.5

* テトラセルミスで培養後、クロレラで 12 時間二次培養したワムシ

** テトラセルミスで培養後、クロレラで 18 時間二次培養したワムシ

*** テトラセルミスで培養後、クロレラで 24 時間二次培養したワムシ

間値である。テトラセルミスワムシの特徴である高濃度のリノレン酸も、併用給餌によりクロレラワムシとの中間値を示す^{47,51)}。また、S 型併用ワムシには約 0.76% の ω 3 HUFA が含まれるが、この値は S 型クロレラワムシとはほぼ等しい。さらに併用ワムシのタンパク質含量は高く、テトラセルミスワムシのそれに近い値を示す。

(3) 二次培養ワムシ

L 型と S 型のテトラセルミスワムシの脂肪酸組成や脂質含量は、クロレラでの二次培養により、クロレラワムシの成分に近くなる^{47,51)}。特に、S 型テトラセルミスワムシに含まれる $\Sigma\omega$ 3 HUFA の量は 12 時間の二次培養で 0.47%, 18 時間で 0.5%, 24 時間では 0.66% と増加する。これらのことから、テトラセルミ

表 4 各種のL型ワムシで飼育したマダイ仔魚の生残率および成長。A₁・A₂: テトラセルミスワムシ給餌区, B₁・B₂: 二次培養ワムシ給餌区, C₁・C₂: 併用ワムシ給餌区, D₁・D₂: クロレラワムシ給餌区 (福所ら 1984)⁴⁷⁾

日 齢	試 験 区	生 残 率 (%)	全 長 (mm)		体 重 (mg)	
			平均 値	標準偏差	平均 値	標準偏差
21	A ₁	95.7	5.8	0.4	1.1	0.3
	A ₂	94.7	5.7	0.4	1.0	0.4
	B ₁	96.7	5.7	0.4	1.2	0.5
	B ₂	96.6	5.7	0.3	1.1	0.4
	C ₁	95.3	5.8	0.5	1.2	0.5
	C ₂	93.4	5.9	0.4	1.3	0.5
	D ₁	93.0	5.8	0.5	1.1	0.5
	D ₂	93.9	6.0	0.4	1.2	0.4
30	A ₁	75.6	8.1	0.8	5.2	1.9
	A ₂	83.5	7.5	0.9	4.2	2.4
	B ₁	74.7	8.5	1.0	6.3	3.1
	B ₂	81.1	9.1	0.9	6.5	2.5
	C ₁	80.1	8.8	1.2	6.6	2.9
	C ₂	68.0	8.7	0.9	6.3	2.5
	D ₁	65.1	6.9	0.8	5.8	2.1
	D ₂	75.6	6.5	0.8	4.7	2.2

スワムシの栄養価は約1日間の二次培養で改善されると考えられる。さらに、二次培養ワムシや併用ワムシはタンパク質含量が多い点では、クロレラワムシに優る良好な餌料であると思われる。

2. 海産仔稚魚に対する餌料価値

(1) マダイ仔魚の飼育実験

マダイ仔魚(日齢 14, 全長 4.95 ± 0.33 mm)にL型のテトラセルミスワムシ, 二次培養ワムシ, 併用ワムシ, クロレラワムシを給餌したところ, 仔稚魚の成長や生残率はクロレラワムシ給餌区に比べて他の3区が優った(表4)。このことから, テトラセルミスワムシの餌料価値は高いと考えられる。特に, 二次培養ワムシと併用ワムシの餌料価値は高く, 仔魚の成長は良好であった。クロレラとの併用や二次培養法は, より餌料価値の高いワムシを生産するための有効な手段であろう。テトラセルミスワムシを給餌した場合, 全長 6 mm 前後でやや斃死魚が増える傾向がある。これは $\omega 3$ HUFA の量が必ずしも十分でないか, または過剰なリノレン酸の影響と思われる。少なくとも, 飼育期間中, いずれの区でも腹部膨満症の仔魚は観られなかった⁴⁷⁾。

(2) ヒラメ仔魚の飼育実験

マダイ仔魚の飼育実験で得た結果をさらに普遍化するため, ヒラメ仔魚(日齢 14, 全長 5.1 ± 0.33 mm)を用いて同様な実験を行った⁵²⁾。ただし, より栄養価の高いワムシを作るため, 二次培養ワムシの代わりに油脂酵母とテトラセルミスを併用して培養した後, クロレラで 12~24 時間二次培養した油脂酵母併用・二次培養ワムシを用いた。日齢 36 までの飼育では, テトラセルミス区の生残率は対照区に比べて約 5% ほど劣るものの, 成長では全長・体重とも対照区に優る結果を得た(表5)。テトラセルミスワムシの栄養添加を狙った油脂酵母併用・二次培養ワムシおよび併用ワムシ給餌区の仔魚の成長からは併用効果は認められなかった(表5)。一方, 生残率ではテトラセルミスワムシ区に優り, 併用効果はあったと言える。生残率の向上を重視する種苗量産では, クロレラとの併用あるいは二次培養が望ましい。

テトラセルミスワムシを給餌すると, ヒラメの体に含まれるリノレン酸の割合は高くなる。海産魚のリノレン酸から高度不飽和酸への変換能は淡水魚に比べて劣るが, 過剰であることによる弊害について, ヒラメ

表 5 各種のL型ワムシで飼育したヒラメ仔魚の生残率および成長。A₁・A₂: テトラセルミスワムシ給餌区, B₁・B₂: 油脂酵母併用二次培養ワムシ給餌区, C₁・C₂: 併用ワムシ給餌区, D₁・D₂: クロレラワムシ給餌区 (福所ら 1985)⁵²⁾

日 齢	試験区	生残率 (%)	全 長 (mm)		体 高 (mm)		体 重 (mg)	
			平均値	標準偏差	平均値	標準偏差	平均値	標準偏差
29	A ₁	93.9	8.3	0.9	2.6	0.5	2.0	1.2
	A ₂	93.1	8.5	0.6	2.7	0.3	2.8	1.0
	B ₁	95.3	9.2	0.6	2.9	0.2	3.1	0.8
	B ₂	96.3	9.5	0.4	2.9	0.3	2.9	1.4
	C ₁	96.4	9.3	0.5	2.8	0.3	2.1	0.8
	C ₂	75.1	8.5	0.5	2.3	0.3	1.8	0.9
	D ₁	96.3	8.8	0.6	2.6	0.3	2.2	0.7
	D ₂	97.4	8.9	0.5	2.7	0.2	2.5	0.8
36	A ₁	91.6	11.2	0.6	3.7	0.4	7.3	1.8
	A ₂	91.5	11.7	0.4	4.1	0.2	9.1	1.3
	B ₁	94.6	10.5	0.7	3.1	0.3	4.2	1.1
	B ₂	95.5	10.5	0.7	3.1	0.3	4.3	1.0
	C ₁	95.1	10.7	0.6	3.0	0.3	5.2	1.3
	C ₂	72.5	9.2	0.7	2.8	0.3	2.8	1.0
	D ₁	95.0	10.5	0.4	2.8	0.3	4.3	0.8
	D ₂	97.3	10.8	0.6	3.1	0.3	5.2	1.1

仔魚の成長, 生残率, 活力はクロレラワムシ給餌区と比べて遜色がなく, 問題はないと思われる⁵²⁾。

(3) クロダイ仔魚の飼育実験

S型テトラセルミスワムシの餌料価値を, クロダイ仔魚(日齢 10, 全長 4.7 ± 0.4 mm)を用いた同様の飼育実験から推定した。日齢 25 まで飼育したところ, テトラセルミス区で仔魚の生残率・成長・活力は他区に比べて著しく劣り⁵¹⁾(表 6), 斃死は, 日齢 18 以後, 特に多くなった。このことから, S型テトラセルミスワムシの餌料価値は低いと言えるが⁵¹⁾, その直接的な原因として次のことが考えられる。1) S型テトラセルミスワムシ中の $\omega 3$ HUFA 量はL型に比べて低く, 海産仔稚魚に必要な最低量(ワムシ中の濃度が 0.3% 以上)に満たないこと。2) テトラセルミスワムシに含まれる過剰なリノレン酸の影響。3) 魚種により仔魚の $\omega 3$ HUFA 要求量に差があり, クロダイでは要求量が高いこと。これらの中では, 二次培養ワムシや併用ワムシ給餌区で斃死魚数が急減することから, $\omega 3$ HUFA 量の不足が大きく影響すると思われる⁵¹⁾。いずれにしても, S型テトラセルミスワムシは, クロレラで栄養添加した後, 給餌する必要がある。

VIII. テトラセルミスのクルマエビ幼生に対する餌料価値

我が国では, テトラセルミス類がクルマエビ幼生用餌料として利用された例は報告されていないが, 1970年代に北米のガルベストーン研究所で甲殻類幼生用餌料として *Tetraselmis* sp. が使用され⁵³⁾, 現在も北米や南米の一部で使用されている。また, 台湾やフィリピンでは *T. chuii* が使用されている⁵⁴⁾。テトラセルミスは, クルマエビの産卵期にあたる 6~8 月に屋外水槽で容易に培養できること, 細胞はクルマエビ幼生が摂餌できる範囲の大きさであること, テトラセルミスに多く含まれるリノレン酸やリノール酸はクルマエビの必須脂肪酸であること⁵⁵⁾, などからクルマエビ幼生用餌料として適当な微小藻類であろうと考えた。そこで, 著者はテトラセルミスのクルマエビ幼生に対する餌料価値を調べ, さらに種苗量産の際, 目安とする好適給餌密度についても検討した⁵⁶⁾。

表 6 各種の S 型ワムシで飼育したクロダイ仔魚の生残率と成長。A₁・A₂: テトラセルミスワムシ給餌区, B₁・B₂: 併用ワムシ給餌区, C₁・C₂: 二次培養ワムシ給餌区, D₁・D₂: クロレラワムシ給餌区 (福所ら 1985)⁵¹⁾

日 齢	試 験 区	生 残 率 (%)	全 長 (mm)		体 重 (mg)	
			平均 値	標準偏差	平均 値	標準偏差
20	A ₁	90.2	8.1	1.1	2.5	1.5
	A ₂	95.5	8.4	0.8	3.0	1.6
	B ₁	97.9	8.9	1.1	4.4	1.9
	B ₂	99.1	10.1	0.7	6.0	1.8
	C ₁	97.9	9.7	0.9	5.5	2.1
	C ₂	98.9	9.8	0.8	5.8	1.9
	D ₁	97.2	9.0	0.8	4.6	1.4
	D ₂	95.6	9.1	0.7	4.4	1.4
25	A ₁	35.9	9.8	1.6	5.9	4.1
	A ₂	57.3	10.2	1.2	5.9	3.0
	B ₁	94.0	11.3	1.1	10.1	3.5
	B ₂	95.5	11.5	1.1	10.4	4.0
	C ₁	91.9	12.0	0.9	12.4	3.6
	C ₂	93.7	11.3	1.3	9.8	4.1
	D ₁	94.6	11.1	1.0	8.7	2.8
	D ₂	93.5	11.4	1.1	9.8	3.7

表 7 テトラセルミスおよびキートセロスで飼育したクルマエビ幼生 (ノープリウス期からミンス 3 期まで) の生残率。A1・2 槽はテトラセルミス, B1・2 槽はキートセロスを給餌

飼育水槽	収容した幼生数 (尾/90l)	終了時の幼生数 (尾/90l)	生 残 率 (%)
A 1	4,500	2,581	57.4
A 2	4,500	2,304	51.2
B 1	4,500	2,807	62.4
B 2*	4,500	—	—

* 実験中にキートセロスが群体を形成し、幼生が斃死したため中止した。

の 62.4% に比べてやや劣った (キートセロス給餌区のうち 1 区は実験中にキートセロスが群体を形成し、幼生は死滅した) (表 7)。飼育期間中、幼生の変態時期や成長に顕著な差はなく、また、いずれの区でもゾエア 3 期以後に摂餌量は急に増加することがわかる (図 28)。一方、屋外実験では、両区が生残率は約 60% で差はなかった (図 29)。藤永・橋高は⁵⁸⁾、好適餌料である浮游珪藻を給餌した場合、ゾエア期幼生の生残率は 50.0%~66.7% (平均 66.0%) であり、不適当な餌料を給餌した場合、生残率は低下し、幼生の変態は順調に行われないことを報告している。このことから、クルマエビ幼生に対するテトラセルミスの餌料価値は高いと言える。また、最近、ミンス期以後の幼生にはアルテミアの代わりにワムシが給餌されている。テトラセルミスはワムシの好適餌料でもあるので³⁹⁾、テトラセルミスを給餌した幼生飼育槽内でのワムシの繁殖も期待できる。

2. テトラセルミスの好適給餌密度

クルマエビ幼生を効率良く量産するには、幼生が順調に成育するために要するテトラセルミスの給餌密度

1. キートセロスとの餌料価値の比較

室内での飼育実験および大量生産を想定した屋外での飼育実験により、テトラセルミスの餌料価値をキートセロス *Chaetoceros ceratosporum* と比較した。*C. ceratosporum* はキートセロス類の中でも耐高温性で、大量培養に適した種である⁵⁷⁾。室内実験は、4 個の 100l ポリカーボネイト水槽を用い、一尾の親エビから得たノープリウス期幼生を 4,500 尾ずつ収容して両微小藻類の給餌試験を行った。ミンス期終了時までの幼生生残率はテトラセルミス給餌区で 57.4% と 51.2% で、キートセロス給餌区

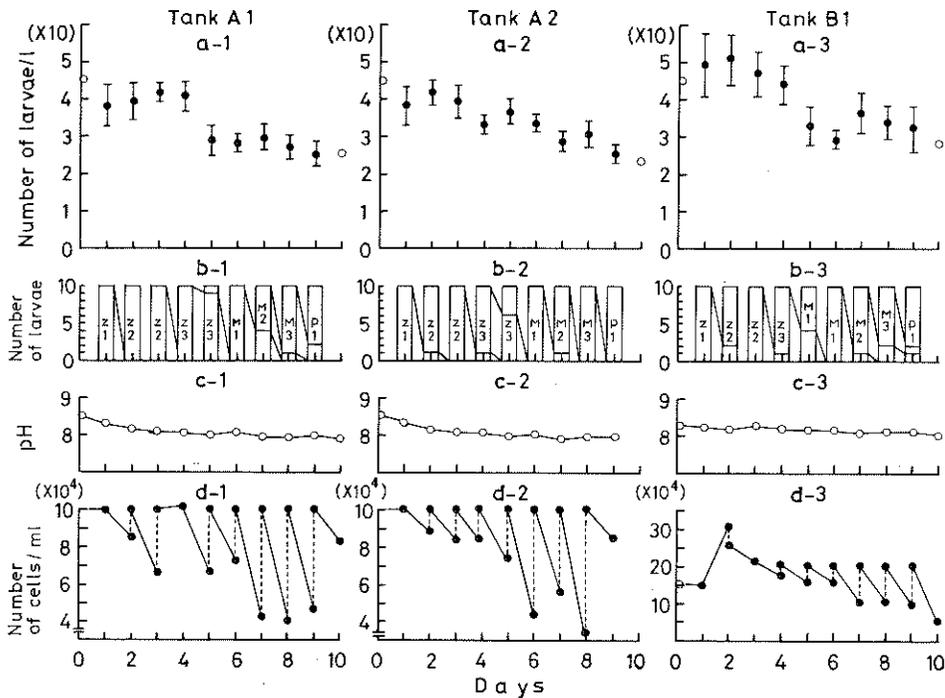


図 28 表 7 に示した実験の飼育経過。a 1~3 は定時に測定した幼生密度 (○印は全幼生を計数し, ●印は 500 ml 中の幼生数を 6 回計数して求めた。), b 1~3 は幼生 10 尾のステージの変化, c 1~3 は午後 2 時に測定した pH 値, d 1~3 は飼育槽内のテトラセルミスの密度 (……は給餌と換水により密度調節を行ったことを示す)。

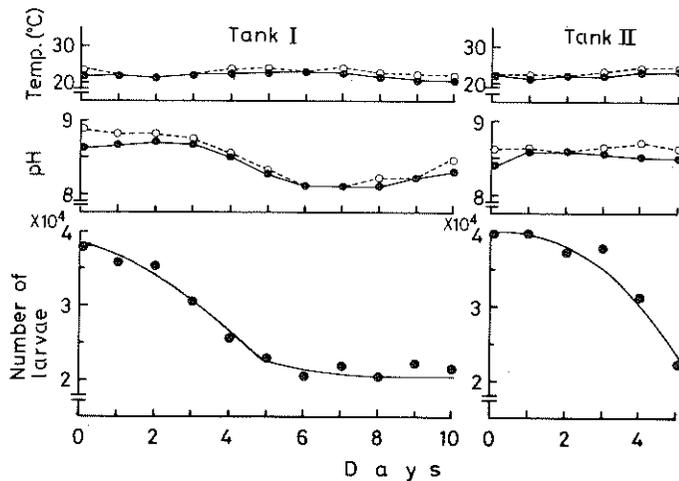


図 29 屋外 100t 水槽でのクルマエビ幼生の飼育。水槽 I にはテトラセルミス, 水槽 II にはキートセロスを給餌した。

表 8 異なる給餌密度で飼育したクルマエビ幼生の成長と生残率

飼育水槽	テトラセルミスの給餌密度 (細胞/ml)	収容した幼生数 (尾/30l)	終了時の幼生数 (尾/30l)	終了時の各ステージの幼生数 (尾/20尾)			生残率 (%)
				ミス1期	ミス2期	ミス3期	
A-1	2.5×10^4	1,000	444	20	0	0	44.4
A-2	2.5×10^4	1,500	883	15	5	0	58.9
A-3	2.5×10^4	1,500	579	12	8	0	38.6
B-1	5.0×10^4	1,000	701	0	1	19	70.1
B-2	5.0×10^4	1,500	928	0	1	19	61.9
B-3	5.0×10^4	1,500	776	0	6	14	51.7
C-1	10.0×10^4	1,000	883	0	0	20	88.3
C-2*	10.0×10^4	1,500	—	—	—	—	—
C-3	10.0×10^4	1,500	752	1	1	18	50.1
D-1	15.0×10^4	1,000	762	0	2	18	76.2
D-2	15.0×10^4	1,500	855	0	1	19	57.0
D-3	15.0×10^4	1,500	953	0	0	20	63.5

* 実験中に幼生が斃死したため、中止した。

を知る必要がある。そこで、12個の30lポリカーボネイト水槽を用い、1,000尾または1,500尾のノープリウス期幼生を収容し給餌飼育実験を行った。実験期間中、テトラセルミスの密度は、毎日定時に計数し、換水と給餌により 2.5×10^4 細胞/ml、 5.0×10^4 細胞/ml、 10.0×10^4 細胞/ml、 15.0×10^4 細胞/mlに調整した。7日間の飼育後、 2.5×10^4 細胞/ml区では幼生生残率は他区に比べて劣り、成長では他区の幼生がミス3期に達する時期にミス1期幼生が大半を占めた(表8)。細胞密度が 5.0×10^4 以上の区では、幼生の生残率や成長に差は認められなかった。このことから、テトラセルミスでクルマエビ幼生を飼育する場合、密度が 5.0×10^4 細胞/ml以上になるよう給餌すればよいことがわかる。

IX. テトラセルミスの二枚貝類幼生に対する餌料価値

二枚貝類幼生の飼育には、パプロバ属の *Pavlova lutheri*、イソクリシス属の *Isocrysis galvana*、あるいはキートセロス属 *Chaetoceros* の小型種等が広く用いられている。これらの微小藻類の餌料価値は極めて高いが²⁾、屋外での粗放的な大量培養は困難である。そのため、テトラセルミス二枚貝類幼生用餌料として活用することが考えられる。我が国ではテトラセルミス類を餌料に使用した例は報告されていないが、既に、北米や英国では小規模ながらテトラセルミス類を餌料として二枚貝類幼生が飼育されている。しかし、その餌料価値の評価は異なる。

LANGDON と WALDOCK⁵⁹⁾ は *T. suecica*、*P. lutheri*、*Dunaliella tertiolecta* のマガキ *Crassostrea gigas* に対する餌料価値を調べ、*T. suecica* が最も餌料価値が高いことを報告している。また、WIKFORS⁶⁰⁾、UKELES と WIKFORS¹⁸⁾ はバージニアガキ *Crassostrea virginica* に対する *T. maculata* の餌料価値を高く評価している。さらに、WALNE と SPENCER⁶¹⁾、UKELES⁶²⁾ は二枚貝類幼生の量産を目的に *T. suecica* および *T. maculata* の給餌試験を行っている。

一方、DAVIS と GULLARD⁶³⁾ は、マルスダレガイの近縁種 *Venus mercenaria* とバージニアガキの飼育試験を行い、*Tetraselmis** sp. の餌料価値はイソクリシスやパプロバ(原著には *Monochrysis* の属名を採用している。)より劣るものの、それらとの併用給餌により餌料価値は高くなることを報告している。また、ROMBERGER と EPIFANIO⁶⁴⁾ もバージニアガキの飼育実験から同様な結果を得ている。これは、テトラセルミス類が他の2種に比べて大きいので、初期の幼生は十分に摂取できないためであろう。小型の餌料藻と併用すれば、やや成長した幼生がテトラセルミス類を摂取するため、幼生の生残率や成長は向上すると考えられる。

テトラセルミス *T. tetrathele* は、テトラセルミス属の中でも大型種であるので、初期の幼生への単独給餌は避けるべきであろう。幼生が成長し、摂餌量が多くなる時期に補給することは効果的であろう。また、今後、*T. maculata* や *T. suecica* などの小型種の探索と導入により、二枚貝類の初期の幼生用餌料として利用できることも期待される。

X. 餌料生物としての展望と今後の課題

1. 展 望

餌料生物の培養は、少ない労力で効率良く行う必要がある。これまで行ってきた研究結果を利用すれば、小・中規模培養での定濁度連続培養 (Turbidostat) や 1 t 以下の培養槽での半連続培養 (Semi-continuous culture) は可能になるだろう。また、元種となるテトラセルミスの簡便な保存法の確立により、計画的な大量培養が可能になると思われる。

テトラセルミス属の中には、小型種から特大種まで様々な種があるが、今のところ増殖特性や餌料価値が確認できたのは *T. tetrathele* の 1 種のみである。今後、他種の外国産テトラセルミス類の移入や日本産テトラセルミス類の探索と増殖特性の解明により、テトラセルミスに続く有用種の導入の可能性もある。

2. 今後の課題

餌料用微小藻類の研究では次の 5 つの課題が掲げられる。1) 好適餌料藻 (あるいは株) の探索。2) 生物学的安全性の把握。3) 培養技術の確立。4) 元種の長期保存法の検討。5) 餌料価値の評価と利用範囲の確認。著者は、この方針でテトラセルミスに関する一連の試験を行ってきた。今後、解決すべき課題は、生活史におけるシスト形成条件の解明、低温での元種の長期保存法の検討、大量培養における捕食動物の駆除法の開発であろう。

テトラセルミスは広温・広塩耐性種であること、粗放的培養法でも大量培養できること、タンパク質含量が高いことなどの特長を持つ種である。しかし、次のような欠点もある。1) ω 3 HUFAs 含量はクロレラに比べて低い。2) クロレラと同様、仔稚魚に摂取されても直接には餌とならないこと⁶⁵⁾。3) 初期の二枚貝幼生用餌料としてはやや大きすぎる。4) 増殖率は高いが定常期の細胞密度はクロレラに比べて低いこと。これらは、テトラセルミスの生物特性であり、人為的に改良することは困難である。これらの諸性状を考慮して、他の有用微小藻類との併用により、テトラセルミスの特長を活かした使い方をすべきであろう。

終わりに、テトラセルミスを同定していただき、助言を賜った筑波大学教授千原光雄博士、同大学助教授堀 輝三博士に対し厚く御礼申し上げます。また、テトラセルミスの栄養価について御教示下さった東京水産大学教授渡辺 武博士、御指導と原稿の校閲をしていただいた養殖研究所遺伝育種部長鈴木 亮博士、同部育種研究室長福所邦彦博士に謹んで感謝の意を表します。

参 考 文 献

- 1) FUKUSHO, K. and M. OKAUCHI (1982) Strain and size of the rotifer, *Brachionus plicatilis* being cultured in Southeast Asian countries. Bull. Natl. Res. Inst. Aquaculture, (3): 107-109.
- 2) 今井丈夫・白石景秀 (1971) 有用微小餌料生物とその培養法. pp. 423-433, 浅海完全養殖 (今井丈夫監修), 恒星社厚生閣, 東京.
- 3) 福所邦彦 (1984) ヲムシ培養餌料としてのテトラセルミス. 養殖, (6): 104-109.
- 4) 岡内正典 (1985) 微小藻類テトラセルミス *Tetraselmis tetrathele* の増殖特性と餌料価値. 水産育種, (10): 1-17.
- 5) 千原光雄・堀 輝三 (1970) 最近のブラシノ藻綱の研究 (I). 藻類, 18(2): 33-42.
- 6) 千原光雄・井上 勲・堀口健雄 (1983) ブラシノ藻類, pp. 116-133, 赤潮マニュアル IV——その他の藻類 (安達六郎・千原光雄・入江春彦), 赤潮問題研究会.

- 7) NORRIS, R. E. (1980) Prasinophyceae. In: E. Cox, ed., *Phytoflagellates*. pp. 85-145, Elsevier Press, Amsterdam.
- 8) NORRIS, R. E., T. HORI and M. CHIHARA (1980) Revision of the genus *Tetraselmis* (Class Prasinophyceae). *Bot. Mag. Tokyo*, **93**: 317-339.
- 9) HORI, T., R. E. NORRIS and M. CHIHARA (1982) Studies on the ultrastructure and taxonomy of the genus *Tetraselmis* (Prasinophyceae)—I. Subgenus *Tetraselmis*. *Bot. Mag. Tokyo*, **95**: 49-61.
- 10) HORI, T., R. E. NORRIS and M. CHIHARA (1983) Studies on the ultrastructure and taxonomy of the genus *Tetraselmis* (Prasinophyceae)—II. Subgenus *Prasinocladia*. *Bot. Mag. Tokyo*, **96**: 385-392.
- 11) BUTCHER, R. W. (1959) An introductory account of the small algae of British coastal waters, part I: Introduction and Chlorophyceae, Fishery Investigations Ser. IV. Ministry of Agriculture, Fisheries and Food, London. 74 pp.
- 12) PARKE, M. and J. C. GREEN (1976) Chlorophyta, Prasinophyceae. In PARKE, M. and P. S. DIXON (Eds.) Check-list of British marine algae—Third revision. *J. Mar. Biol. Ass. U. K.*, **56**: 564-566.
- 13) TANoue, E. and Y. ARUGA (1975) Studies on the life cycle and growth of *Platymonas* sp. in culture. *Jap. Journ. Bot.*, **20**(8): 439-460.
- 14) 高原隆明・堀 輝三 (1975) プラチモナスとブラシノモのシスト形成と発芽について. *藻類*, **23**: 111-115.
- 15) MANTON, I. and M. PARKE (1965) Observations on the fine structure of two species of *Platymonas* with special reference to flagellar scales and the mode of origin of the theca. *J. Mar. Biol. Ass. U. K.*, **45**: 743-754.
- 16) 平田八郎・平田 肇・山崎繁久・小平田栄一 (1985) 緑色鞭毛藻 *Tetraselmis tetrathele* の増殖日周性. 昭和 60 年度日本水産学会春季大会講演要旨集, p. 187.
- 17) 岡内正典・福所邦彦 (1984) ブラシノ藻類テトラセルミス *Tetraselmis tetrathele* の培養特性. *養殖研報*, (5): 1-11.
- 18) UKELES, R. and G. H. WIKFORS (1982) Design, construction, and operation of a rearing chamber for spat of *Crassostrea virginica* (GMELIN). *Jour. Shellfish Res.*, **2**: 35-39.
- 19) GATESOUBE, F. J. and J. H. ROBIN (1982) The dietary value for sea bass larvae *Dicentrarchus labrax* of the rotifer *Brachionus plicatilis* fed with or without a laboratory cultured alga. *Aquaculture*, **27**: 121-128.
- 20) 堀 輝三・千原光雄 (1970) 最近のブラシノ藻綱の研究 (II). *藻類*, **18**(2): 88-95.
- 21) 谷本静史・堀 輝三 (1975) 本邦沿岸におけるブラシノ藻の分布について (I). *藻類*, **23**(1): 14-18.
- 22) 千原光雄 (1980) その他の鞭毛藻 pp. 21-26, 赤潮に関する近年の知見と研究の問題点 (赤潮研究会編集委員会編). 日本水産資源保護協会, 東京.
- 23) YANASE, R. and T. IMAI (1968) The effect of light intensity and temperature on the growth of several marine algae useful for rearing molluscan larvae. *Tohoku J. Agr. Res.*, **19**(1): 75-82.
- 24) LAING, I. and M. M. HELM (1981) Factors affecting the semi-continuous production of *Tetraselmis suecica* (KYLIN) BUTH. in 200-l vessels. *Aquaculture* **22**: 137-148.
- 25) 岩崎英雄 (1975) 植物プランクトンの増殖 pp. 64-73, 海洋プランクトン (海洋科学基礎講座 6). 東海大学出版会, 東京.
- 26) 岩崎英雄 (1979) 培養液の種類と組成 pp. 281-293, *藻類研究法*, (西澤一俊・千原光雄編). 共立出版株式会社, 東京.
- 27) 岩崎英雄 (1979) 微細藻類の分離と培養, pp. 166-189, 同誌.
- 28) PROVASOLI, L., J. J. A. McLAUGHLIN and M. R. DROOP (1957) The development of artificial media for marine algae. *Arch. Mikrobiol.*, **25**: 392-428.
- 29) LOOSANOFF, V. L. and H. C. DAVIS (1963) Rearing of bivalve mollusks, In F. S. RUSSELL, *advances in marine biology*, l'Acad. Press.
- 30) 田中彌太郎 (1981) 二枚貝類の初期稚貝期に発生した微小生物の駆除について. *水産増殖*, **28**(4): 171-173.
- 31) 天神 僚 (1978) アワビ人工採苗研究—I. アワビ採苗板に発生する橈脚類および繊毛虫類の駆除方

- 法について。福島県水試研報, (5): 85-88.
- 32) 伊藤 隆 (1980) シオミズツボワムシの培養に関する基礎的研究—VI. 人工汽水の塩分濃度, 塩類組成のシオミズツボワムシの生残および増殖に対する影響. アユの人工養殖研究, (5): 129-146.
 - 33) 市村輝宜 (1979) 藻体の保存法 pp. 312-316, 藻類研究法 (西澤一俊・千原光雄編), 共立出版株式会社, 東京.
 - 34) 久米恒雄 (1979) 海産絨毛虫類の分離および保存培養に関する検討. うみ(日仏海洋学会誌), 17(2): 62-64.
 - 35) UMEBAYASHI, O. (1972) Preservation of some cultured diatoms. *Bull. Tokai Reg. Fish. Res. Lab.*, (69): 55-62.
 - 36) 岡内正典・福所邦彦 (1984) テトラセルミス *Tetraselmis tetrahele* のシオミズツボワムシに対する餌料価値—I. パッチ式培養におけるワムシの増殖. 養殖研報, (5): 13-18.
 - 37) 平野慶二・平山和次 (1984) テトラセルミス (*Tetraselmis tetrahele*) を餌としたシオミズツボワムシの個体群増殖. 長崎大学水産学部研報, (56): 21-23.
 - 38) HIRAYAMA, K., K. TAKAGI and H. KIMURA (1979) Nutrition effect of eight species of marine phytoplankton on population growth of the rotifer, *Brachionus plicatilis*. *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.*, 45(1): 11-16.
 - 39) 岡内正典・福所邦彦 (1983) テトラセルミスによるシオミズツボワムシ培養における好適給餌密度. 昭和 58 年度日本水産学会秋季大会講演要旨集, p. 107.
 - 40) 岡内正典・福所邦彦・KRAISINGDECHA, P.・WAHYUNI, I. S. (1984) テトラセルミスのシオミズツボワムシに対する餌料価値—II. S 型ワムシの培養. 昭和 59 年度日本水産学会秋季大会講演.
 - 41) 福所邦彦 (1983) 形態とその変異, pp. 35-51. 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, 東京.
 - 42) 大上皓久 (1979) 油脂酵母を投与した時のシオミズツボワムシの大きさについて. 伊豆分場だより, (195): 10-11.
 - 43) 福所邦彦・岩本 浩 (1981) シオミズツボワムシの大きさにおよぼす餌の影響. 養殖研報, (2): 1-10.
 - 44) SNELL, T. W. and K. CARRILLO (1984) Body size variation among strains of the rotifer *Brachionus plicatilis*. *Aquaculture*, 37: 359-367.
 - 45) YUFERA, M. (1982) Morphometric characterization of a small sized strain of *Brachionus plicatilis* in culture. *Aquaculture*, 27: 55-62.
 - 46) 渡辺 武 (1983) 栄養価, pp. 94-101. 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, 東京.
 - 47) 福所邦彦・岡内正典・SITI NURAINI・辻ヶ堂 諦・渡辺 武 (1984) テトラセルミスで培養したシオミズツボワムシのマダイ仔稚魚に対する餌料価値. 日水誌, 50(8): 1439-1444.
 - 48) PARSONS, T. R., K. STEPHENS and J. D. H. STRICKLAND (1961) On the chemical composition of eleven species of marine phytoplankton. *J. Fish Res. Bd. Canada*, 18: 1001-1016.
 - 49) FABREGAS, J., J. ABALDE, C. HERRERO, B. CABEZAS and M. VEIGA (1984) Growth of the marine microalga *Tetraselmis suecica* in batch cultures with different salinities and nutrient concentrations. *Aquaculture*, 42: 207-215.
 - 50) TESHIMA, S., S. YAMASAKI, A. KANAZAWA and H. HIRATA (1983) Effects of water temperature and salinity on eicosapentaenoic acid level of marine *Chlorella*. *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.* 49(5): 805.
 - 51) 福所邦彦・岡内正典・田中秀樹・KRAISINGDECHA, P.・WAHYUNI, I. S.・渡辺 武 (1985) テトラセルミスで培養したシオミズツボワムシのクロダイ仔稚魚に対する餌料価値. 養殖研報 (8): 5-13.
 - 52) 福所邦彦・岡内正典・田中秀樹・WAHYUNI, I. S.・KRAISINGDECHA, P.・渡辺 武 (1985) テトラセルミスで培養したシオミズツボワムシのヒラメ仔魚に対する餌料価値. 養殖研報, (7): 26-35.
 - 53) GRIFFITH, G. W., M. A. MURPHY KENSLOW and L. A. ROSS (1973) A mass culture method for *Tetraselmis* sp.—A promising food for larval crustaceans. Proc. 4th Ann. Workshop. Wld. Mariculture Soc. Monterrey, Mexico, pp. 289-294.
 - 54) TOBIAS-QUNITIO, E. and C. T. VILLEGAS (1982) Growth, survival and macronutrient composition of *Penaeus monodon Fabricius* larvae fed with *Chaetoceros calcitrans* and *Tetraselmis chuii*. *Aquaculture* 29: 253-260.
 - 55) KANAZAWA, A., S. TOKIWA, M. KAYAMA and M. HIRATA (1977) Essential fatty acids in the

- diet of prawn—I Effects of linoleic and linolenic acids on growth. *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.* 43 (9): 1111-1114.
- 56) 岡内正典・平野保男 (1985) クルマエビ幼生に対するテトラセルミス *T. tetrahele* の餌料価値. 昭和 60 年度日本水産学会秋季大会講演要旨集, p. 55.
 - 57) 田中彌太郎 (1982) 二枚貝類幼生餌料としての耐高温性珪藻 *Chaetoceros ceratosporum* OSTENFELD の有用性について. 養殖研報, (3): 31-36.
 - 58) 藤永元作・橋高二郎 (1966) クルマエビ幼生の変態と餌料. 日本プランクトン研究連絡会報, (13): 83-94.
 - 59) LANGDON, C. J. and M. J. WALDOCK (1981) The effect of algal and artificial diets on the growth and fatty acid composition of *Crassostrea gigas* spat. *J. mar. biol. Ass. U. K.*, 61: 431-448.
 - 60) WIKFORS, G. H., J. W. TWAROG, JR., and R. UKELES (1984) Influence of chemical composition of algal food sources on growth of juvenile oysters, *Crassostrea virginica*. *Biol. Bull.*, 167: 251-263.
 - 61) WALNE, P. R. and B. E. SPENCER (1974) Experiments on the growth and food conversion efficiency of the spat of *Ostrea edulis* L in a recirculation system. *Cons. int. Explor. Mer.*, 35 (3): 303-318.
 - 62) UKELES, R. 1980. American experience in the mass culture of micro-algae for feeding larvae of the American oyster, *Crassostrea virginica*. pp. 287-306 in *Algae Biomass, Production and Use*, G. SHELEF and C. J. SOEDER, eds. Elsevier/North-Holland Biomedical Press, Amsterdam.
 - 63) DAVIS, H. C. and R. R. GUILLARD (1958) Relative value of ten genera of microorganisms as foods for oyster and clam larvae. *Fish. Bull.* (United States), 58: 293-340.
 - 64) ROMBERGER, H. P. and C. E. EPIFANIO (1981) Comparative effective of diets consisting of one or two algal species upon assimilation efficiencies and growth of juvenile oysters, *Crassostrea virginica* (GMELIN). *Aquaculture*, 25: 77-87.
 - 65) JUARIO, J. V. and V. STORCH (1984) Biological evaluation of phytoplankton (*Chlorella* sp., *Tetraselmis* sp. and *Isochrysis galbana*) as food for milkfish (*Chanos chanos*) fry. *Aquaculture*, 40: 193-198.