

魚類の餌用ゾウリムシの継代培養

*山口大学NBRPゾウリムシの藤島先生に依頼し、種の同定に向けて解析中です。
現在、18SrRNA遺伝子の解析中です。

ここに魚類の餌用ゾウリムシ(Y-2株 (PS000001A))の調製方法を記載する。通常、培養にはゾウリムシの餌（細菌）が必要だが、この種には必要ない。以下のようにエビオス錠オートクレーブ水を調製し、それにゾウリムシを加えるだけで良い。

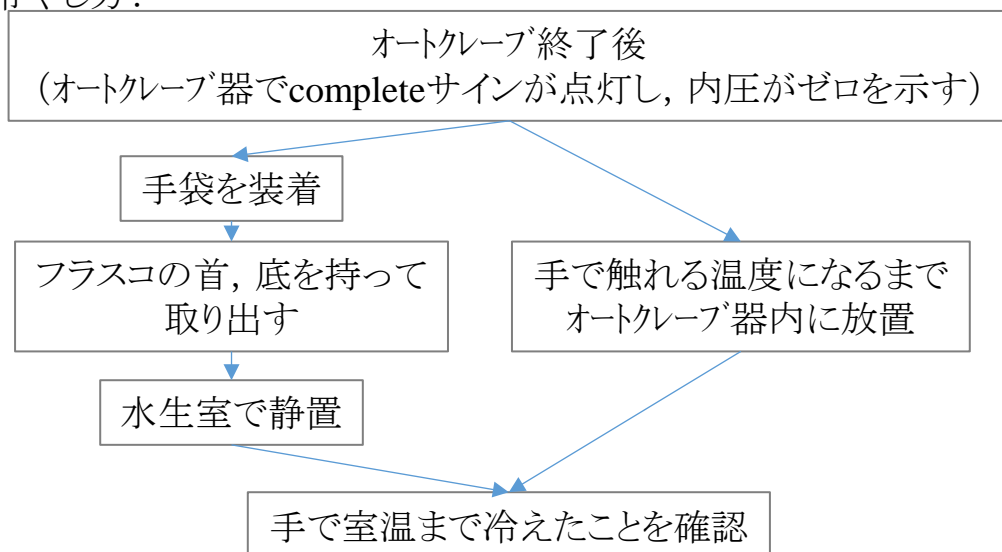
※次ページ以降に、オートクレーブ前のエビオス錠水、オートクレーブ後のエビオス錠水、ゾウリムシ培養中の様子(継代1日後～15日後)を写真で示した。

必要なもの

- ・500 mL 三角フラスコ
- ・500 mLフラスコ用シリコ栓(通気可能なもの)
- ・エビオス錠(アサヒフードアンドヘルスケア株式会社)
- ・アルミホイル
- ・電動ピペット(継代用には新しいピペット。餌用は使い回しOK)
- ・ゾウリムシ(Y-2株 (PS000001A))培養液(写真12-23の状態のもの)
NBRPゾウリムシ(山口大学)より餌用ゾウリムシの分譲が行われています。
http://nbrpcms.nig.ac.jp/paramecium/distribution_deposition/

エビオス錠オートクレーブ水の調製

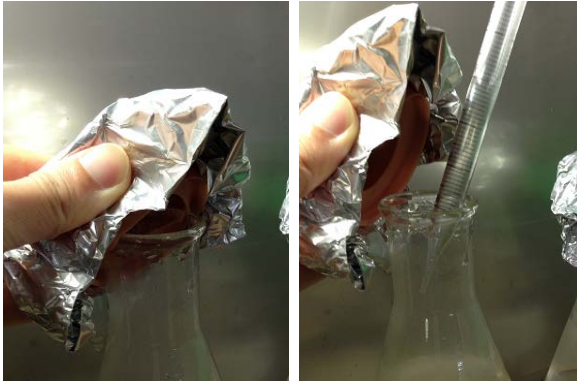
1. 500mL三角フラスコ(オートクレーブ未済)に450mLの脱イオン水を入れる。
2. 1錠のエビオス錠をエビオス錠瓶の蓋に取り、三角フラスコに入れる。
※エビオス錠、瓶内を手で触らないということ。
3. シリコ栓をし、蓋部分のみアルミホイルを被せオートクレーブする。
※ゾウリムシは通気培養が必要なため、通気可能なシリコ栓を使用する。
※アルミホイルの理由は蒸発を防ぐため。
3. 室温(23-26°C)まで冷やす。
※冷やし方:



ゾウリムシ培養液の継代, 使用に向けて.

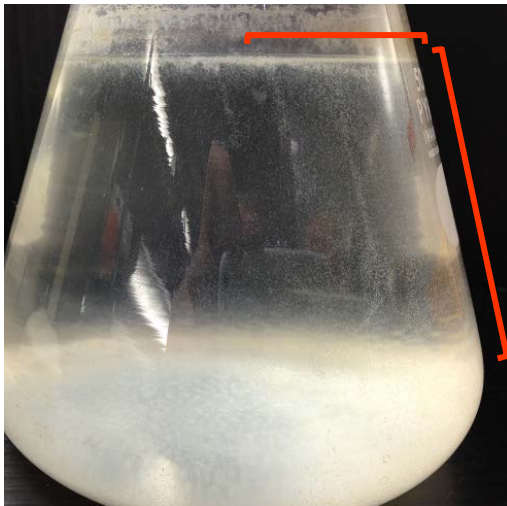
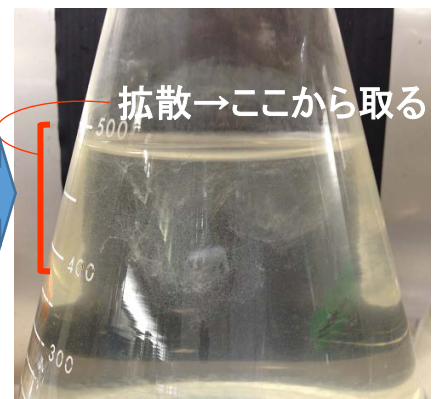
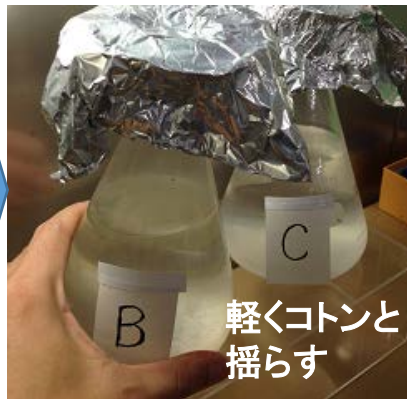
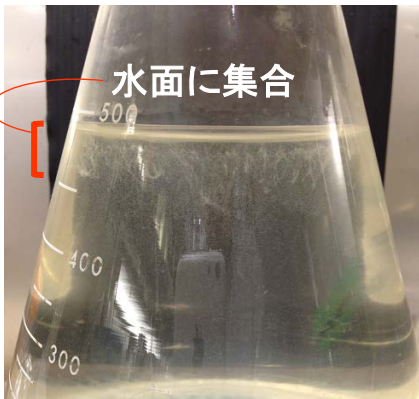
・シリコ栓の開閉方法

シリコ栓の開閉はメダカ飼育室で行っても良いが, 全開しない.
このくらい↓開けて, 継代, 採水等を行う.



・ゾウリムシ培養液の採水方法

継代, 餌用として採水する場合, ゾウリムシ密度の高い部位から採水する. ゾウリムシが水面に集まり過ぎて取りにくい場合は, 軽く揺らし(三角フラスコの底の一部が浮くくらい傾けて, コトンと戻す)軽く拡散させて採水する. 培養液の設置環境によっては, 水面ではなく側面に密度の高い部位があることもある. その場合, そこから取る.

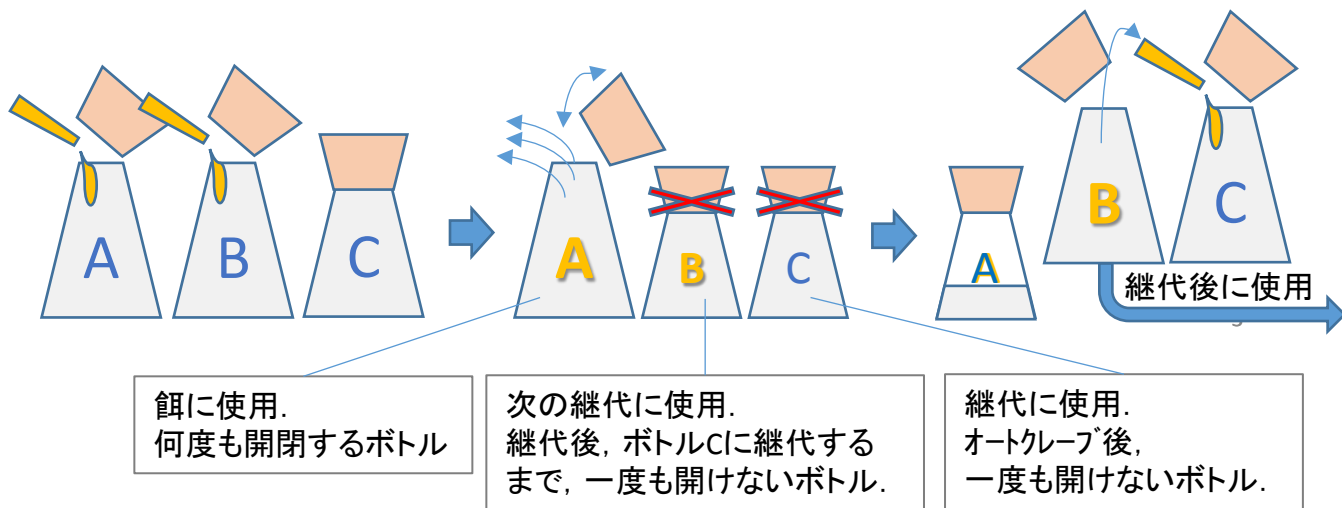


揺らしてないけど
右側に高密度ゾウリムシ
部位がある様子

同様子を示す拡大
写真は5ページ以降
にあります.

ゾウリムシの継代

コンタミ防止のために3本以上のエビオス錠オートクレーブ水（仮にフラスコA, B, Cとする）を準備し、餌用フラスコ(A)と継代用フラスコ(BとC)を常に準備する. 稚魚が多い場合、餌用フラスコの本数を増やす.



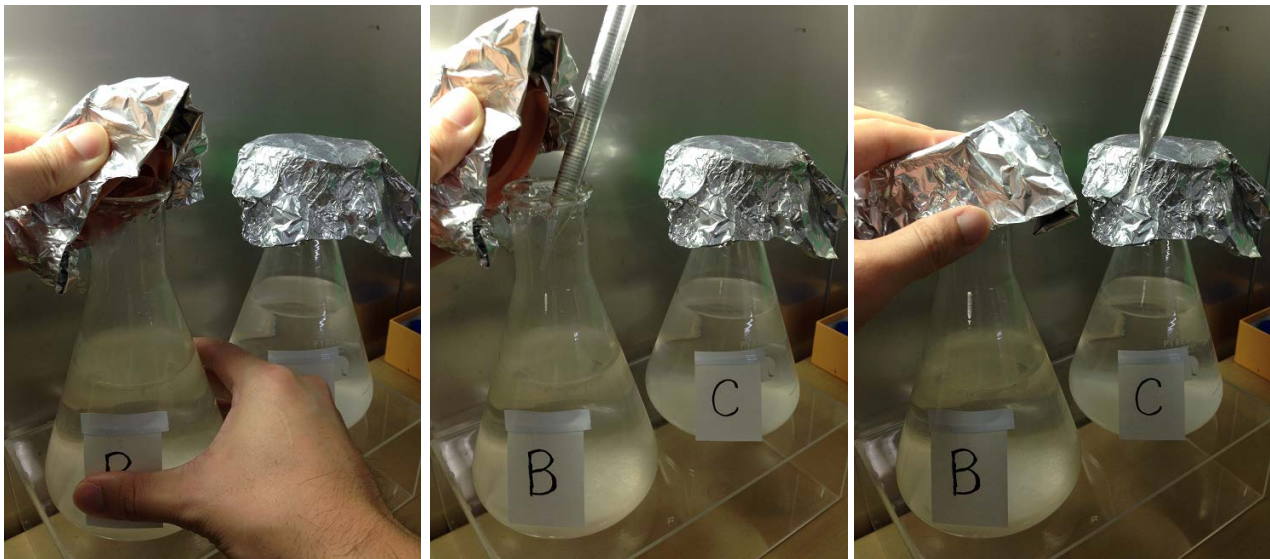
継代方法

1. 約10mLのゾウリムシ液をフラスコA, Bに加え(加え方は下の写真), ゾウリムシが十分増殖するまで待つ(写真12の様子になるまで待つ).
2. フラスコA液を稚魚用の餌に使用する.
フラスコB液はフラスコCへ継代するための培養液とする. コンタミ防止のため, 次に継代するまでフラスコBは開けない. フラスコCも開けない.
3. フラスコA液が少なくなったら, フラスコBからフラスコCへ継代した後, フラスコBを稚魚用の餌に使用する↓写真.

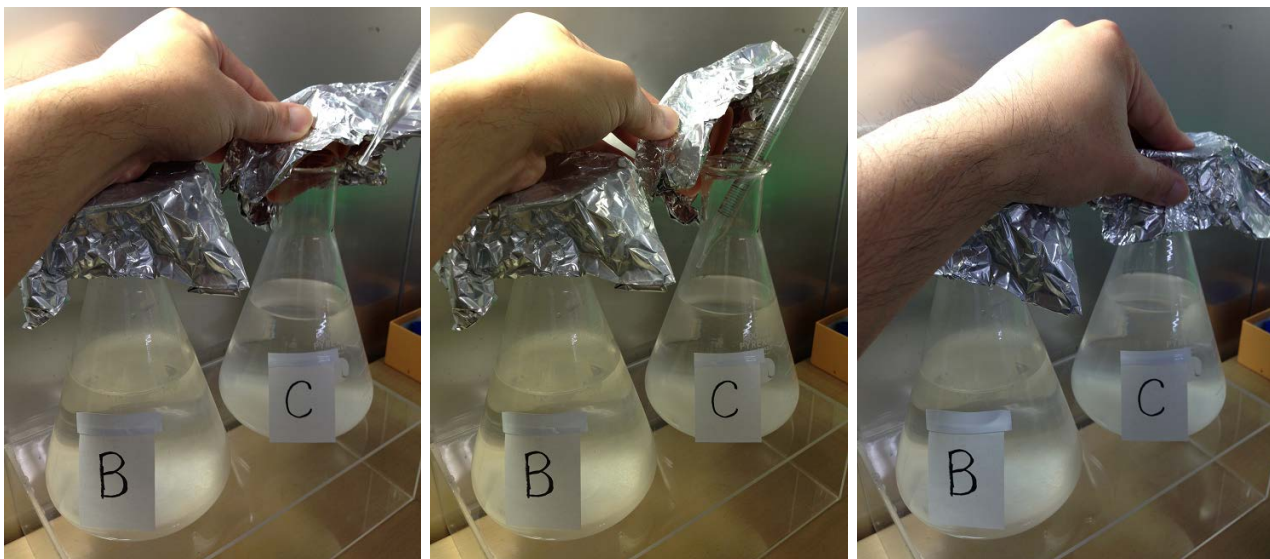
電動ピペッターと新しいピペットを使って,



フラスコBの高密度ゾウリムシ部分から約10mLを取り,



フラスコCに入れる.



使用したピペットは餌用ピペットとして使用する.

4. フラスコAを水道水で2-3回注いで洗浄後, それを用いて新たなエビオス錠オートクレーブ水を調製する.
5. フラスコB液が無くなったら, フラスコCから次のフラスコへ継代後, フラスコCを餌用として使う.
6. 上記繰り返し.



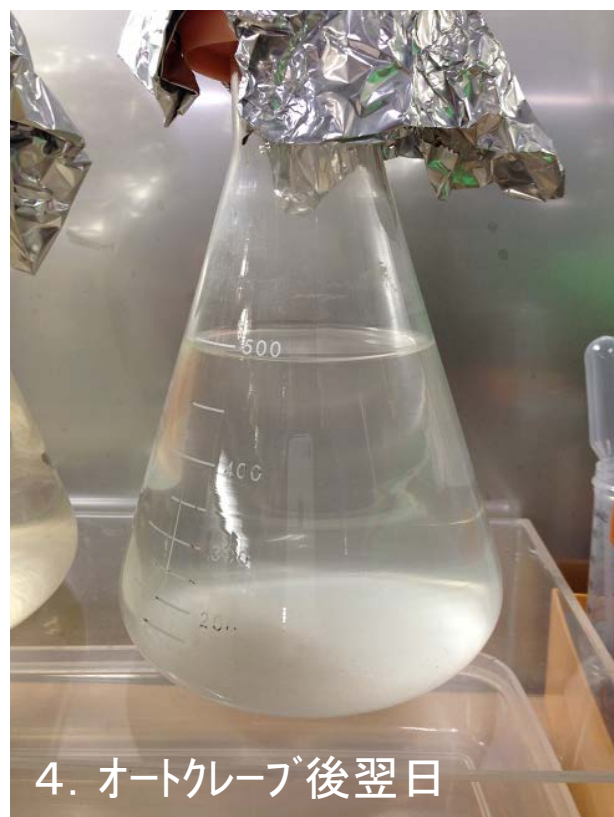
1. オートクレーブ前



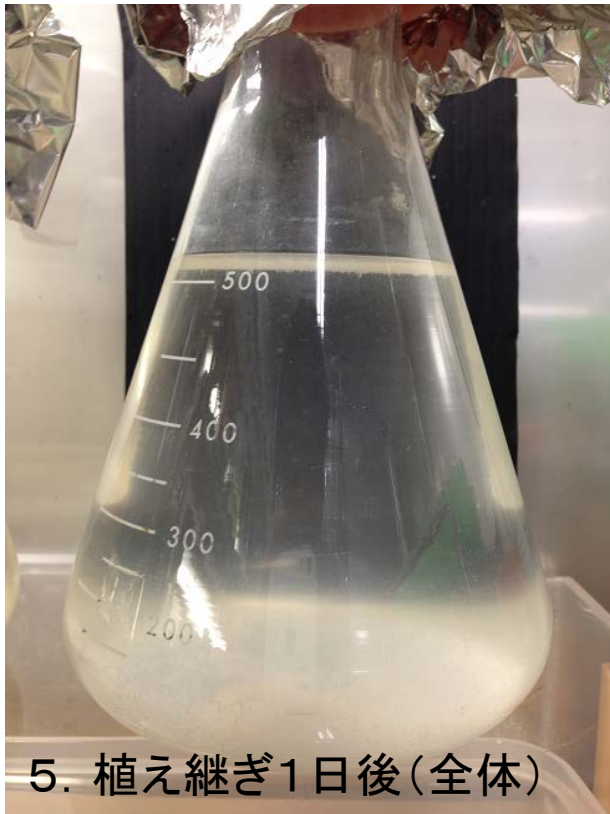
2. オートクレーブ後(全体)



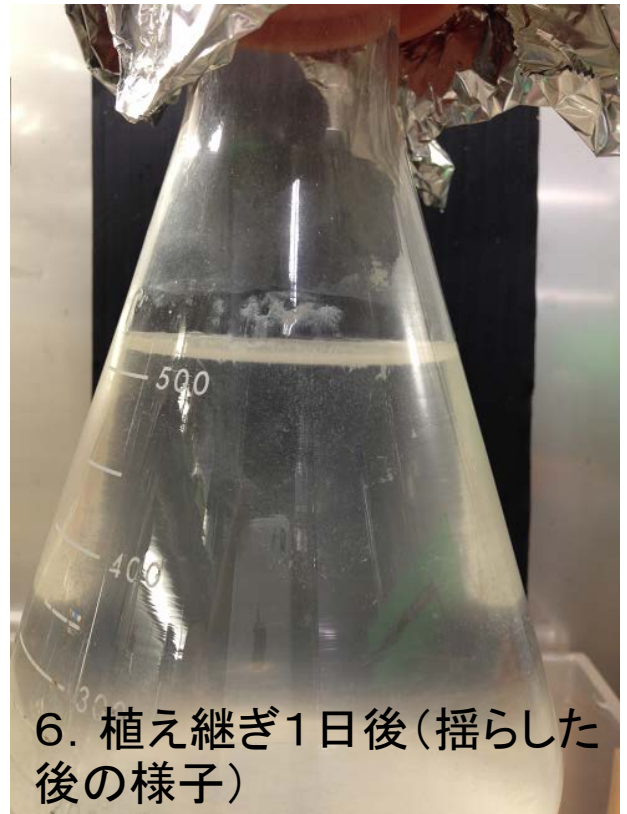
3. オートクレーブ後(底)



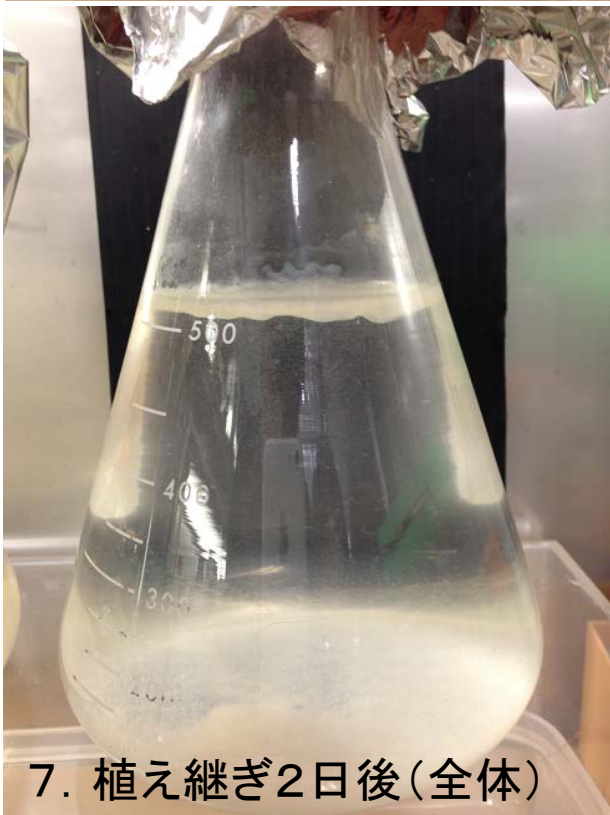
4. オートクレーブ後翌日



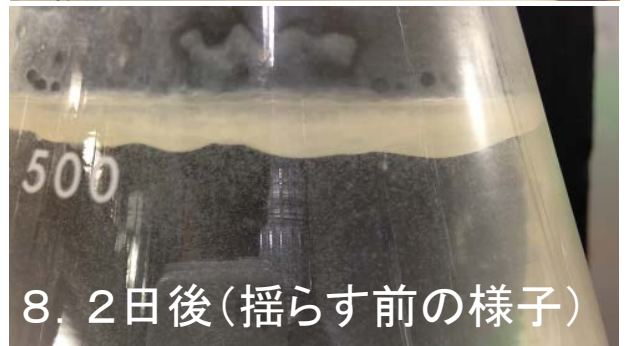
5. 植え継ぎ1日後(全体)



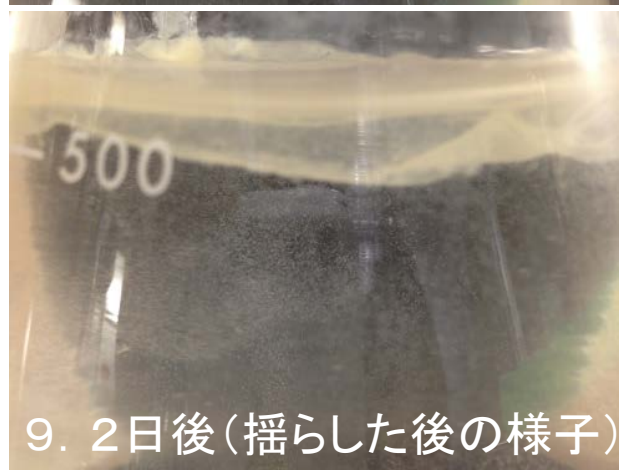
6. 植え継ぎ1日後(揺らした後の様子)



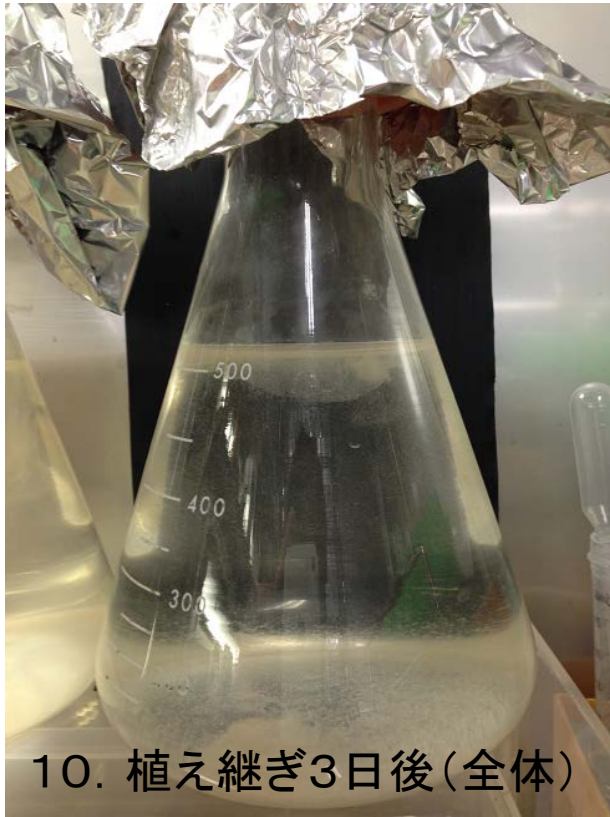
7. 植え継ぎ2日後(全体)



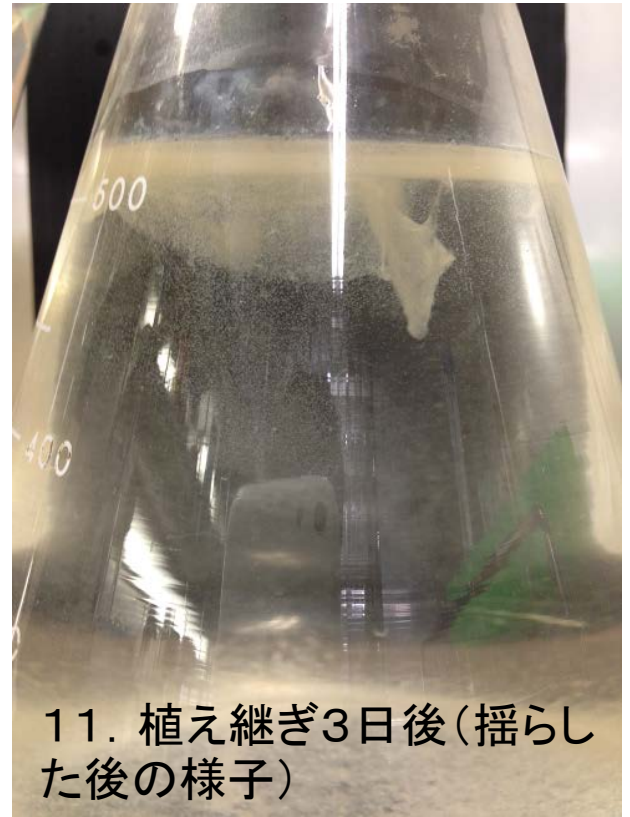
8. 2日後(揺らす前の様子)



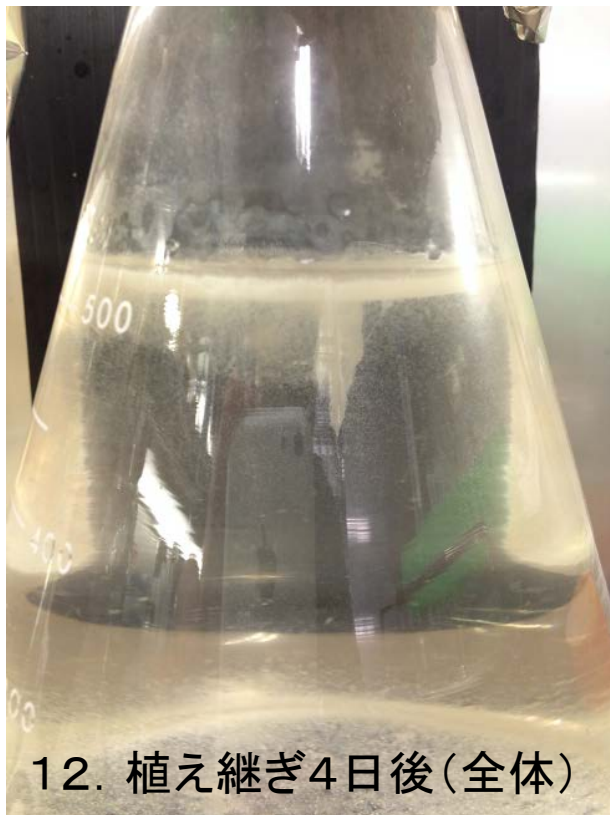
9. 2日後(揺らした後の様子)



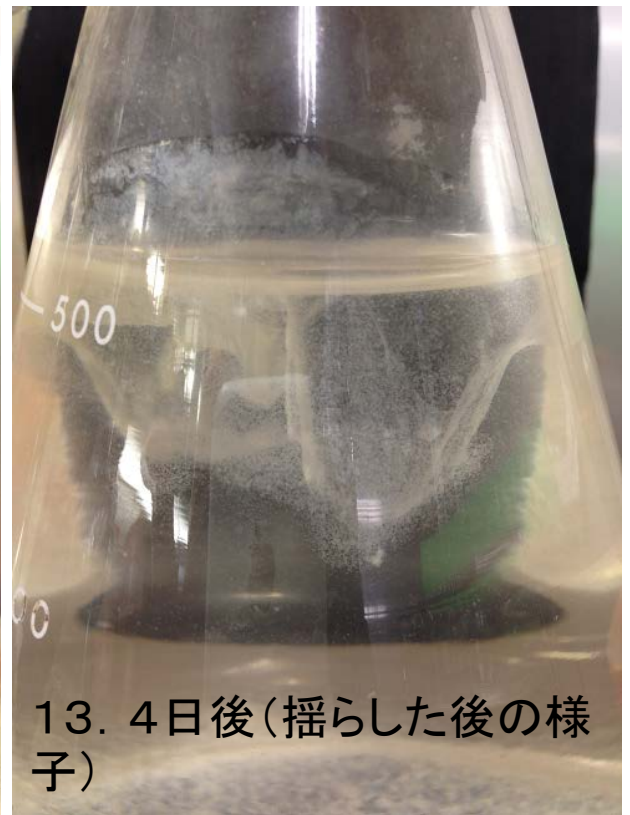
10. 植え継ぎ3日後(全体)



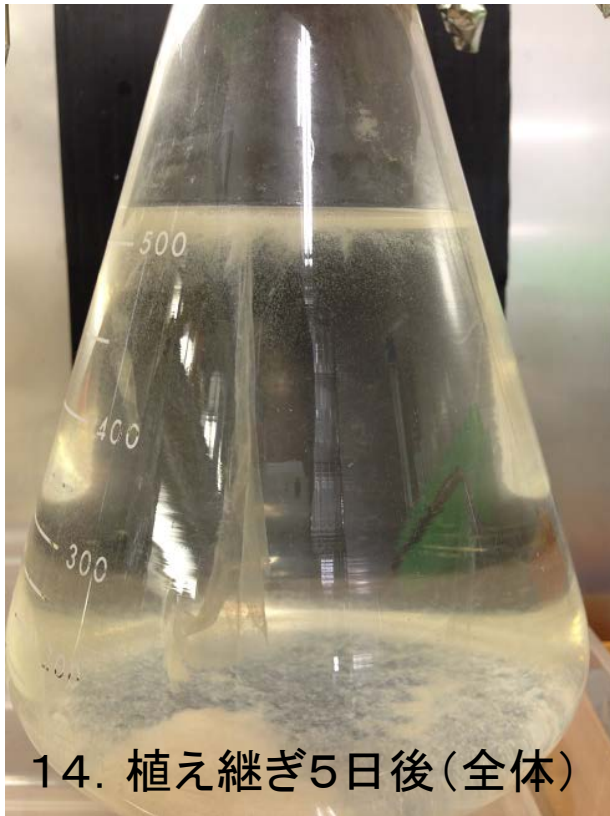
11. 植え継ぎ3日後(揺らした後の様子)



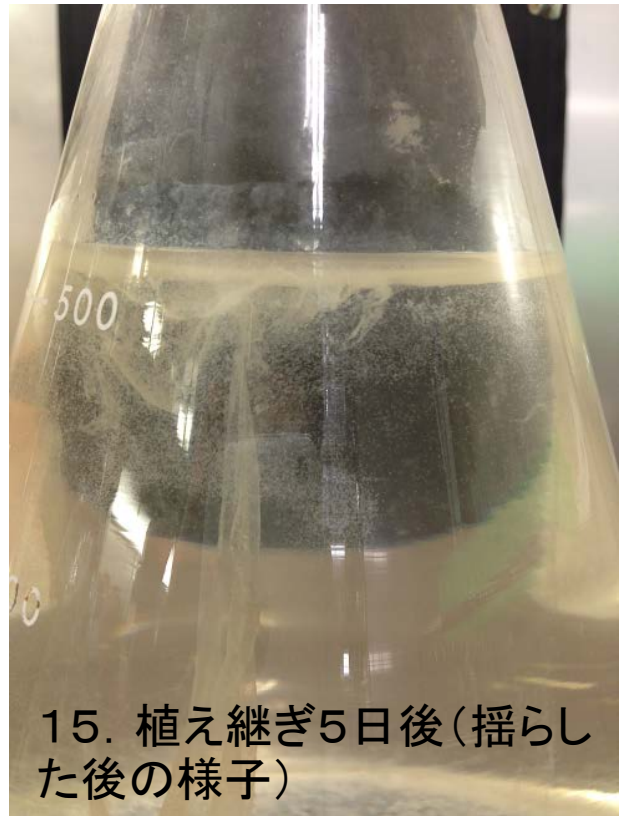
12. 植え継ぎ4日後(全体)



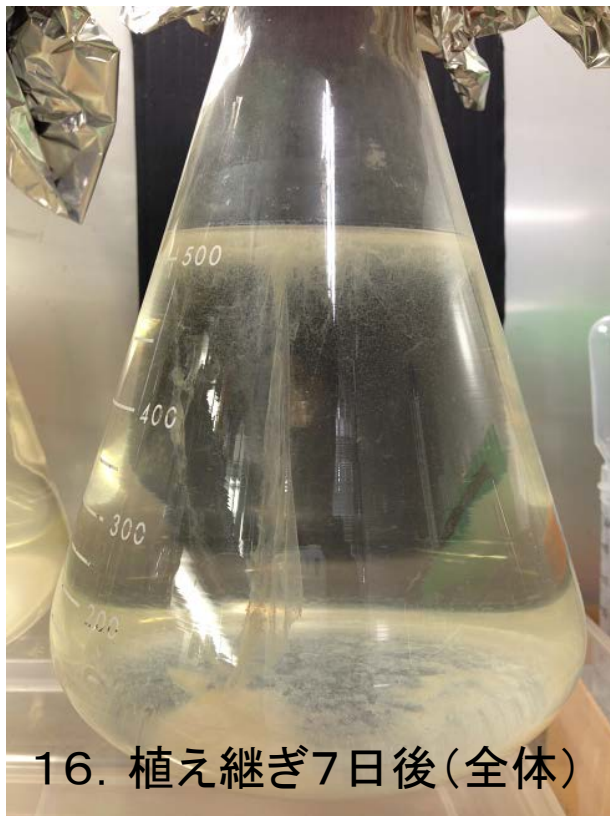
13. 4日後(揺らした後の様子)



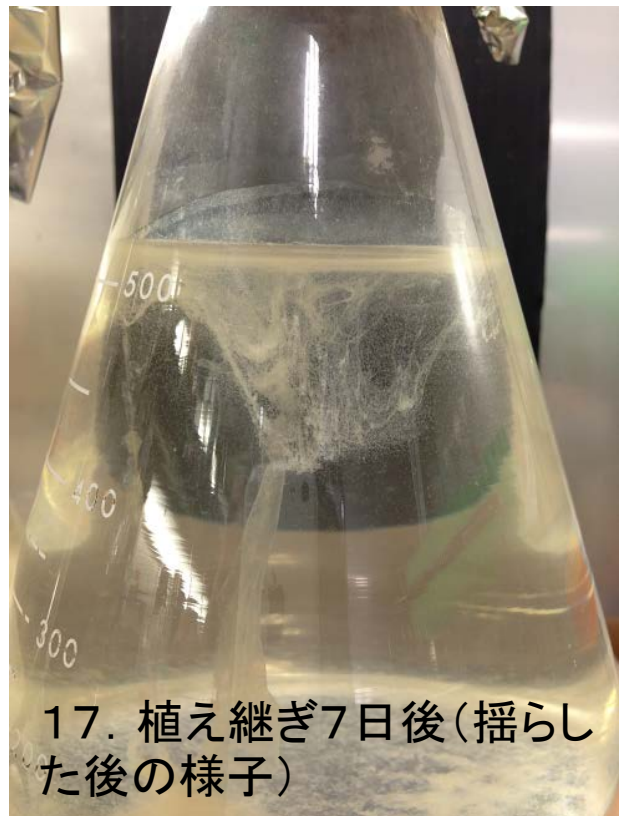
14. 植え継ぎ5日後(全体)



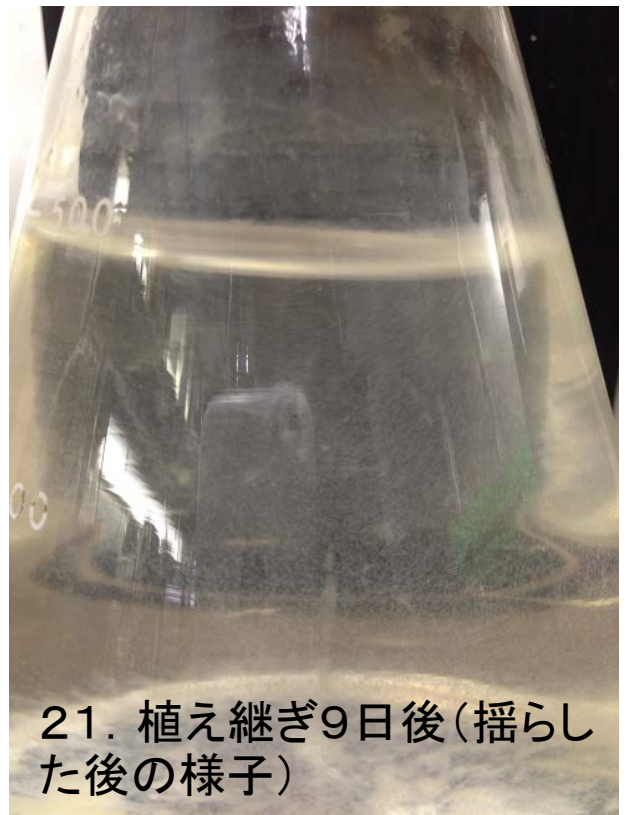
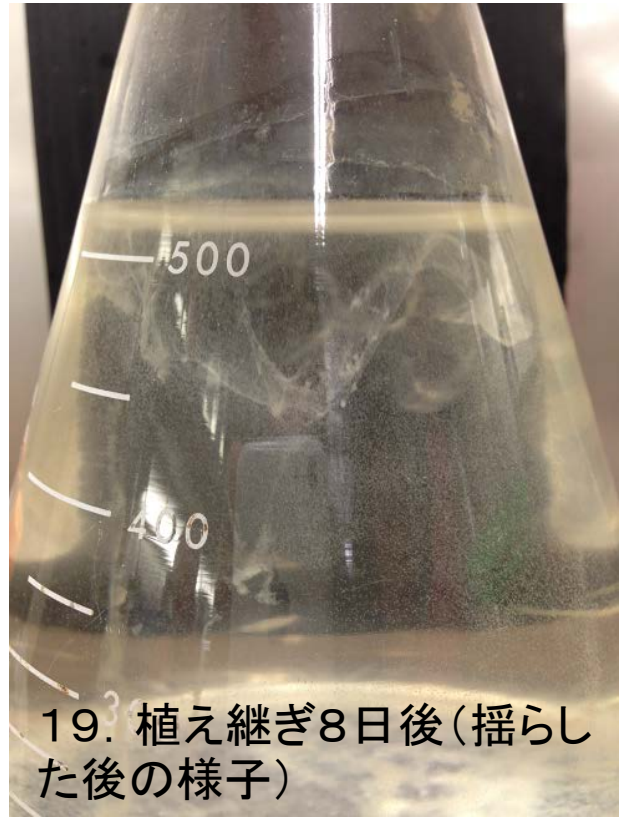
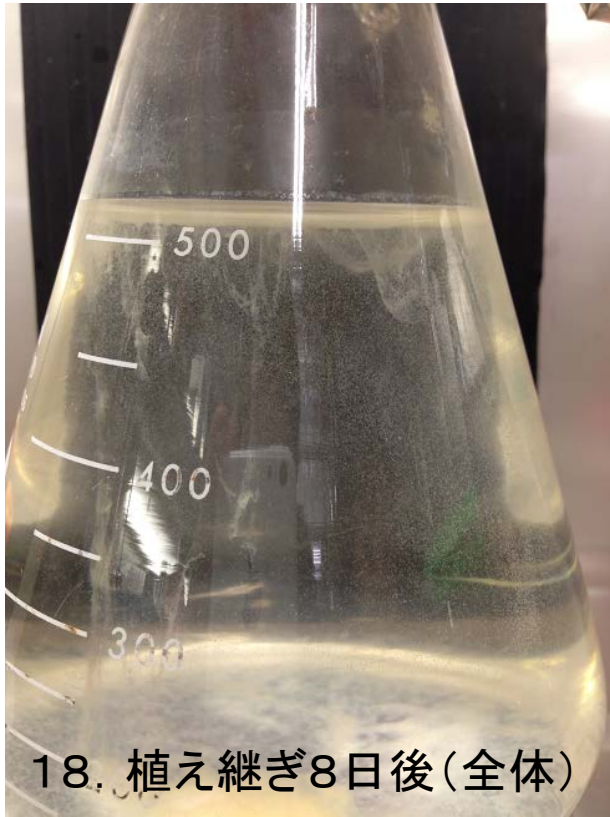
15. 植え継ぎ5日後(揺らした後の様子)

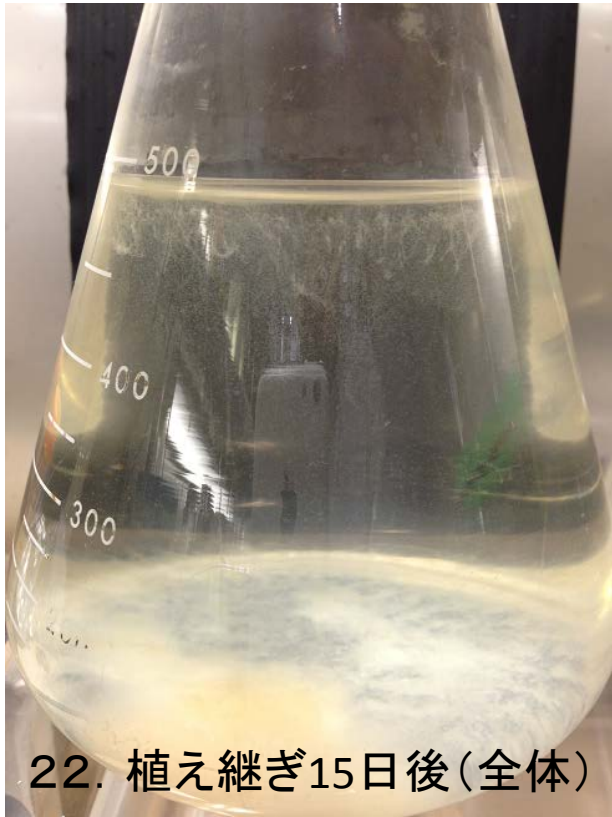


16. 植え継ぎ7日後(全体)

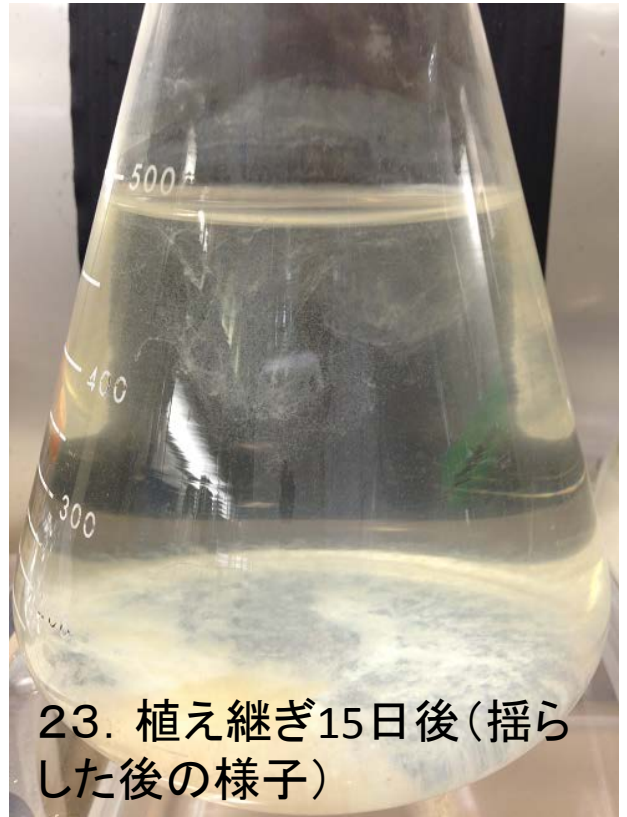


17. 植え継ぎ7日後(揺らした後の様子)





22. 植え継ぎ15日後(全体)



23. 植え継ぎ15日後(揺らした後の様子)

孵化直後の稚魚とゾウリムシ



孵化直後の稚魚と粉餌(ひかりラボM130)とゾウリムシ (※粉餌[水面]にピントを合わせたので他がぼやけて見えます)





基礎生物学研究所 バイオリソース研究室
(現:杏林大学医学部衛生学公衆衛生学教室)
菅田慎一 2016年3月