ワムシ類の安定生産技術と品質について

小 磯 雅 彦*

（水産総合研究センター能登島栽培漁業センター）

Stable mass production technique and quality as live feed of the euryhaline rotifer *Brachionus plicatilis*

MASAHICO KOISO

Notojima Station, National Center for Stock Enhancement, Fisheries Research Agency, Nanao, Ishikawa 926-0216, Japan

1. はじめに

ワムシ類は、1960年の伊藤による海水馴致の成功¹⁾を契機として、海産の魚類や甲殻類の種苗生産に導入され、現在では、種苗生産の初期餌料生物として必要不可欠な存在となっている。近年のワムシ大量培養は、工場生産によって品質が安定している濃縮淡水クロレラが餌料として導入され、それを利用して高密度培養法²⁾や連続培養法³⁾および粗放連続培養法⁴⁾などの新たな培養法が開発されたことで、従来の植え継ぎ式や間引き式の大量培養に比べて、培養の安定性や効率性および作業性が大幅に改善されている。また、10億個体単位のL型ワムシを冷蔵宅配便で輸送する高密度輸送法⁵⁾が開発されたことで、各機関での種ワムシの保存培養や大量培養の前に行う拡大培養を排除することができるとともに、培養不調が起こった種苗生産機関に対して直接的な手段でサポートすることも可能となってきた。さらに近年では、大量培養技術だけにとどまらず、ワムシ単性生殖卵の消毒法やワムシの活性が飼育成績に及ぼす影響が検討されるなど、ワムシの品質についても論じられるようになってきた。

ここでは、能登島栽培漁業センターが行ってきたワムシ培養技術に関する様々な取り組みを中心として、まず“粗放連続培養法”の基本的な理論と仕組みを説明して実際の培養環境・管理について紹介し、次にワムシの大量輸送法として開発された“高密度輸送法”と“ワムシ単性生殖卵の消毒法”および“ワムシの活性が仔魚飼育に及ぼす影響”について紹介して、最後に今後の展開を述べる。

2. 粗放連続培養法

粗放連続培養法とは、連続培養法の理論を既存の水槽に展開した培養法である。このため、先ず連続培養法の理論と仕組みを説明してから、粗放連続培養の培養環境・管理について紹介する。

図1 連続培養装置の基本構成（餌マリノフォーラム 21。平成7年度連続培養システム基礎研究に関する報告書。図Ⅳ-1 連続培養実証装置全体構成図を一部改変）

連続培養法の理論と仕組み 連続培養法は、餌マリノフォーラム 21 と日本栽培漁業協会（現：水産総合研究センター）との共同研究で開発されたもので、培養水中に発生するアンモニア態素素などの増殖阻害要因を連続的な注水と収穫によって希釈することで、培養水の環境を定常状態で維持する一種の流水式の培養法である（図1）。^{6,7)} 特筆すべき点は、培養管理の考え方に安定培養下では飽食レベル以下に設定した給餌量と希釈率を一定値に固定して、ワムシ個体群自体がその条件に応じて密度を自律的に調整するケモスタット式を採用している点である。

ケモスタット式の培養管理 ケモスタットは、タービドスタットと対比して用いられる生態学の用語である。ケモスタット式の培養原理については、以下に具体的な培養事例を示して説明する（図2）。培養水量 1 kL でワムシ密度 500 個体/mL として、濃縮クロレラ給餌量 5 L と希釈率 0.7（1日当たりの注水量/培養水量を示す）に固定して連続培養を行った場合を例に説明する。ワムシ密度が 500 個体/mL から 450 個体/mL に低下すると、ワムシ 1 個体当たりの餌の割り当て量が増加する

* Tel : 81-767-84-1182. Fax : 81-767-84-1184. Email : koisoma@fra.affrc.go.jp

図2 ケモスタット式の培養管理でのワムシ密度と総卵率の推移

培養は、1 kL 水槽を用いて濃縮淡水クロレラ 5 L の給餌量と希釈率 0.7 を固定して粗放連続培養法で行った。

ために産卵速度が増して増殖率が高くなり、翌日以降にはワムシ密度が 500 個体/mL に回復する。反対に、ワムシ密度が 550 個体/mL に増加すると、ワムシ 1 個体当たりの餌の割り当て量が減少するために産卵速度が減速して増殖率が低くなり、翌日以降にワムシ密度が 500 個体/mL に近づく。連続培養のケモスタット式培養管理では、この様にワムシ密度がある範囲内で自律的に調整される。一方、ワムシ密度の変化に応じて給餌量や希釈率を変動させると、ワムシ密度が 450 個体/mL に減少した時に、給餌量を 4.5 L に減らすとワムシ密度は確実に減少し、変化を助長する悪循環に陥る可能性が高い。従来法の植え継ぎ式や間引き式の培養管理は、ワムシ密度の計数値やワムシの活性および残餌状況などから経験的に判断して行うのに対して、ケモスタット式の培養管理では、一定の注水量と給餌量で行われるため、その作業は極めて単純であり自動化することも可能である。

連続培養装置 これらの連続培養法の理論や仕組みを閉鎖系のシステムに応用し、集約化および自動化したものが“連続培養装置”である。培養水量が 1 kL の連続培養装置を用いて S 型ワムシの密度を 5,000 個体/mL とした培養事例では、100 日以上 の長期間にわたって日産 30 億個体を生産できている。

粗放連続培養法の培養環境・管理 粗放連続培養法は、連続注水・連続給餌・連続収穫をケモスタット式に管理するという連続培養の基本は忠実に守りながら、特定の装置ではなく比較的大型の既存の培養水槽を用いて低密度で管理する培養法である。能登島栽培漁業センターでの粗放連続培養は、25 kL 水槽 2 槽をサイホンで結び、給餌量と希釈率を固定して培養環境を維持させるケモスタット式で培養管理を行っている (図 3)。以下に能登島栽培漁業センターの粗放連続培養法の培養環境・管理について記述する。

① 培養環境：培養水温は、L 型ワムシでは 10～30℃、

図3 能登島栽培漁業センターでの 25 kL 水槽での粗放連続培養の模式図

S 型ワムシでは 22～30℃ の範囲としている。培養水の塩分は、増殖促進効果があり飼育槽へ投与しても塩分差による衰弱・死亡が起こらない範囲内とするために、L 型ワムシは 60% 希釈海水、S 型ワムシは 80% 希釈海水を用いている。⁸⁾ 通気は、25 kL 水槽の底面 4 角に長さ 1 m のユニホースを 4 基設置して、培養水が水平方向にゆっくり循環するように弱通気で行う。ワムシ密度は、通常は 200 個体/mL 以内と低密度であるが、酸素通気を行うことで 1,000 個体/mL まで高めることができる。給餌は、濃縮淡水クロレラとパン酵母を混合したものを餌料効率が改善される連続給餌で添加する。⁹⁾ 餌料の混合割合は、濃縮淡水クロレラ 1 L に対してパン酵母 0.5 kg が基準である。

② 培養管理：粗放連続培養法では発生したフロックを弱通気により水槽底面に沈下させているため、フロック除去に関わる一切の作業を排除している。植え替えについては、培養破綻の前には培養水中の残餌や原生動物の増加、総卵率の低下などの前兆が認められるが、この判断には豊富な経験を必要とする。そこで、能登島栽培漁業センターでは、培養例数を重ねることで培養破綻が起こる時期 (培養日数) を事前に把握しておき、その時期よりも早い段階で植え替えを行っている。最近では連続培養日数は 30 日目前後である。

以上のような培養環境・管理で粗放連続培養法を行った結果、従来法の植え継ぎ式や間引き式の培養法に比べてワムシの増殖率が向上し (図 4)、ワムシ作業の省力化ができ、比較的長期間の安定培養が可能となった。特に、従来の培養法では安定培養が困難であった L 型ワムシの培養が計画的に安定して行えるようになり、その中でも水温 20℃ 以下での培養も可能とした。これによって、口径の大きい仔魚には大型の L 型ワムシを、低温で飼育する魚種には低温で培養したワムシを供給するなど、飼育仔魚の生態に応じた様々なワムシの選択の自由度が大幅に増した。粗放連続培養法は、連続培養装置に比べて閉鎖性に劣るためにワムシの増殖を阻害する微生物や他のワムシ株が混入する危険性はあるが、培養の

図4 各水温でのL型ワムシの粗放連続培養法における日間増殖率(●)と従来法での日間増殖率(○)

安定性や作業性の点では連続培養装置と同様に優れた培養法である。また、連続培養法の考え方を間引き式培養法に応用しても、粗放連続培養法とほぼ同様な培養成績が得られている。

3. 高密度輸送法

近年のワムシ類の大量培養は、上記の粗放連続培養法を含めた新たな培養法により従来の培養法に比べて格段に安定性が増したことを述べてきた。しかしながら、無菌培養でない限り有害微生物の混入によるワムシ密度の急減や増殖不調を完全になくすることができないため、供給量不足が生じた時の対策が必要である。この対策として能登島栽培漁業センターでは、10億個体のL型ワムシをダンボール箱1個に梱包して冷蔵宅配便で輸送する高密度輸送法⁵⁾を開発した。

高密度輸送法とは、L型ワムシが水温4℃で約2週間冷蔵保存できる¹⁰⁾ことから、その低水温に強い特性を利用し、輸送容器や収容量などの様々な輸送条件を検討して、L型ワムシの高密度での輸送を可能としたものである。その手順は、収穫したL型ワムシを海水で洗浄した後、酸素を飽和させた10℃の冷却海水で急冷し、これを10万個体/mLの密度に濃縮して酸素と共に輸送用密閉容器に入れ、ダンボール箱に梱包して冷蔵宅配便で輸送する。2002～2004年度の高密度輸送は、年度ごとの輸送回数が95～112回、輸送ワムシ数が560～621億個体、到着時の生残率が72～82%であった。なお、高密度輸送されたワムシは、到着翌日から正常に増殖し始め、到着の2日後から10億個体単位で収獲して仔魚飼育に供給することも可能であり、利用において全く問題はない。

高密度輸送法での注意点は、輸送到着時のワムシが5℃前後で輸送されるため、低温により活性が低下していることである。到着直後に20～25℃の水温に直接ワムシを収容しても生残率にはほとんど影響はないが、この時、強通気を行うと活性の回復していないワムシが泡

に取り込まれて水面に浮上して死亡率が高くなる。また、輸送後にワムシの活性が回復するには3時間程度の時間を要し、収容直後に計数を行うと多くのワムシが水槽底面に沈下していることで実数値よりも低めに推定される。これらの点に注意して取り扱うことで、高密度輸送されたワムシはより有効的に利用できる。

ワムシの高密度輸送法を有効に活用することによって、緊急時のサポートだけでなく、輸送されたワムシで種苗生産を行うなど栽培漁業センター間での業務分担も可能になると考えられる。

4. ワムシ単性生殖卵の消毒法

一般的にワムシは $10^8 \sim 10^9$ CFU/gの細菌を保有していることから、魚類や甲殻類の種苗生産においては、細菌性疾患の感染源として疑われてきた。¹¹⁻¹³⁾ その対策として、これまで単性生殖卵の数十粒単位での無菌処理法¹⁴⁾やワムシ培養槽内での抗生物質投与および給餌前の抗菌剤による薬浴や紫外線照射¹⁵⁾等の様々な減菌処理法が試みられてきた。しかしながら、これらの方法では数十億個体単位のワムシを扱う現場では実用性に欠け、また抗生物質の大量使用や減菌効果が不十分などの問題が残された。

そこで能登島栽培漁業センターでは、薬剤耐性が虫体より強いワムシ単性生殖卵をグルタルアルデヒド濃度1,250 mg/Lに30分間浸漬することで、99.99%以上の生菌数を減少させる方法を開発した(特願05-052347)。¹⁶⁾ 防疫は現在の種苗生産において重要な課題の1つである。この消毒法は、ワムシの培養開始時の元種に不要な細菌の混入を防止するために利用でき、また前述の高密度輸送法と組み合わせることによって、高密度輸送法における防疫対策が向上すると考えられる。このため、単性生殖卵を大量に確保する手法の開発や、消毒処理された卵の高密度輸送法の技術開発にも取り組んでいる。

5. ワムシの活性が仔魚飼育に及ぼす影響

ワムシの量的な確保の次に来る技術開発課題として、餌料としての品質が挙げられる。ワムシの品質に関する研究としては、これまで高度不飽和脂肪酸で代表される栄養学的な研究は数多く行われており、また、培養ワムシ自体の“活性”という観点では、高塩分耐性¹⁷⁾やエステラーゼなどの酵素活性¹⁸⁻²⁰⁾を指標とした研究が報告されている。種苗生産の現場では、ワムシの活性により栄養強化剤の取り込み速度や量、ならびに仔魚飼育槽内での浮遊性すなわち仔魚への食べられやすさ等が異なる可能性が考えられていたが、活性の影響を実験的に明らかにすることは困難であった。

このため能登島栽培漁業センターでは、ワムシの活性の指標になりうる増殖率に着目し、増殖率の異なるワムシをマダイ²¹⁾とヒラメ²²⁾に給餌して飼育実験を行っ

た。この結果、両種とも、生残率には違いが認められなかったが、成長においては増殖率の高いワムシを摂餌した仔魚で全長が有意に大きくなることが示された。このことからワムシの活性が魚類の種苗生産結果に影響することが明瞭に示され、ワムシの活性についてもその重要性が再認識されるようになってきた。

6. 今後の課題

近年のワムシの大量培養では、科学的な理論に基づいた新たな培養法の開発と普及により、これまで最も重要な課題であった安定培養はほぼ達成され、さらに培養の効率性や作業性も大幅に改善されつつある。今後は、活性、栄養価、細菌叢などの点からワムシの品質について総合的に評価し、高品質なワムシを大量に安定培養する技術を開発して、種苗生産現場で検証していく必要がある。様々な大きさのS型やL型ワムシを様々な水温で自在に培養できるようになったことで、魚種ごとに最適なワムシを検討しなおすことも必要と考える。また、高密度輸送法では、防疫面での改善に加えて、色々なワムシ株を自在に高い生残率で輸送できるように更なる技術の向上に取り組んでいる。

最後に、近い将来大量培養で排出されるワムシの糞や残餌などの有機物による環境負荷の問題は、無視できない課題となると考えられる。現在は、能登島栽培漁業センターでは排水処理施設を利用した浄化を行っているが、今後、ゼロエミッション化を目標として、閉鎖循環式の培養についても取り組んでいく必要がある。

文 献

- 1) 伊藤 隆. 輪虫の海水培養と保存について. 三重大紀要 1960; **3**: 708-740.
- 2) 吉村研治, 宮本義次, 中村俊政. 濃縮淡水クロレラ給餌によるワムシの高密度大量培養. 栽培技研 1992; **21**: 1-6.
- 3) Fu Y, Hada A, Yamashita T, Yoshida Y, Hino A. Development of a continuous culture system for stable mass production of the marine rotifer *Brachionus*. *Hydrobiologia* 1997; **358**: 145-151.
- 4) 桑田 博. 日裁協におけるワムシ大量培養技術開発の取り組み. ミニシンポジウム ワムシ大量培養法の進展とその現状. 日本誌 2001; **67**: 1140-1141.
- 5) 桑田 博. シオミズツボワムシの高密度宅配. 月刊養殖 2001; **4**: 76-79.
- 6) 鈔マリノフォーラム 21. 平成 7 年度連続培養システム基礎研究に関する報告書. 研究開発報告書平成 7 年度 No. 5. 鈔マリノフォーラム 21, 東京. 1996; 4.
- 7) 日野明德. ワムシ連続培養装置. アクアネット 1998; **1**: 45-48.
- 8) 小磯雅彦, 日野明德. 培養水の塩分がシオミズツボワムシの増殖, 培養コスト, 栄養強化に及ぼす影響. 水産増殖 2001; **49**: 41-46.
- 9) 小磯雅彦, 友田 努, 桑田 博, 日野明德. ワムシの増殖と生産コストに及ぼす連続給餌の効果. 栽培技研 2005; **32**: 1-4.
- 10) Lubzens L, Kolodny G, Perry B, Galai N, Sheshinski R, Wax Y. Factors affecting survival of rotifers (*Brachionus plicatilis* O. F. Müller) at 4°C. *Aquaculture* 1990; **91**: 23-47.
- 11) 楠田理一, 横山 淳, 川合研児. クロダイ仔稚魚のいわゆる腹部膨満症に関する細菌学的研究. 日本誌 1986; **52**: 1745-1751.
- 12) 安信秀樹, 室賀清邦, 丸山敬悟. マダイ仔魚の腸管膨満症に関する細菌学的検討. 水産増殖 1988; **36**: 11-20.
- 13) 増村和彦, 安信秀樹, 岡田直子, 室賀清邦. ヒラメ仔魚の腸管白濁症原因菌としての *Vibrio* sp. の分離. 魚病研究 1989; **24**: 135-141.
- 14) 平山和次. シオミズツボワムシ培養に関する最近の知見. 昭和 63 年度栽培漁業技術研修事業基礎理論コース. 餌料生物シリーズ No. 8. 水産庁, 東京. 1988; 1-16.
- 15) 山野井英夫, 杉山瑛之. シオミズツボワムシの保有細菌数に及ぼすニフルスチレン酸ナトリウム薬浴と紫外線照射の影響. 水産増殖 1987; **35**: 191-195.
- 16) 渡辺研一, 篠崎大祐, 小磯雅彦, 桑田 博, 吉水 守. シオミズツボワムシ複相単性生殖卵の消毒. 日本誌 2005; **71**: 294-298.
- 17) 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 1999; **47**: 249-256.
- 18) Araujo AB de, Snell TW, Hagiwara A. Effect of unionized ammonia, viscosity and protozoan contamination on the enzyme activity of the rotifer *Brachionus plicatilis*. *Aquaculture Research* 2001; **31**: 359-366.
- 19) Araujo AB de, Hagiwara A. Application of enzyme activity test for the diagnosis of rotifer mass culture. *Bull. Fac. Fish. Nagasaki Univ.* 2001; **82**: 85-91.
- 20) Araujo AB de, Hagiwara A. Screening methods for improving rotifer culture quality. *Hydrobiologia* 2005; **546**: 553-558.
- 21) 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魚に対する餌料価値. 日本誌 2004; **70**: 573-582.
- 22) 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. 日本誌 2005; **71**: 555-562.