アルコール発酵母液を用いた微生物フロックによる
シオミズツボウムシ *Brachionus plicatilis* の培養^{*1}

東原孝規・福岡誠一・安部敏男
水原一瓢・今田克・平野礼次郎

1982年10月19日受理

Culture of the Rotifer *Brachionus plicatilis* Using a Microbial
Flock Produced from Alcohol Fermentation Slop

Takanori HIGASHIHARA,^{*2} Seiichi FUKUOKA,^{*2} Toshio ABE,^{*3}
Ippyo MIZUHARA,^{*3} Osamu IMADA,^{*4} and Reiji HIRANO^{*5}

The culturing of rotifer *Brachionus plicatilis* using a microbial flock (AFS-Flock), as food, produced from the alcohol fermentation slop (AFS) was examined, with the aim of utilizing AFS. The AFS-Flock was found to be an effective food for rotifer. When the rotifer was fed with the AFS-Flock, the density of rotifer in the culture broth was maintained at over 200 individuals (ind.)/ml for about one month. Several strains of bacteria and yeasts were isolated from the AFS-Flock. Most isolated bacteria could not grow abundantly on the medium containing AFS as the sole source of carbon and energy. However, most of the isolated yeasts assimilated AFS rapidly and abundantly. The results of culturing rotifer using cultural cells and broth of the isolated yeasts cultured with AFS, indicated that those of the isolated yeasts were an effective food also. When the culture broth of most effective isolated yeast cultured with AFS was fed to the rotifer, the highest density of rotifer was at 394 ind./ml in eight days of culture time. It was concluded that the AFS-Flock is hopeful as new food for rotifer.

糖蜜を原料としたアルコール発酵母液（母液）は国内で年間 180 万 kl 発生しているといわれている。¹⁾ この母液は、酵母菌体、非発酵性糖、アミノ酸、有機酸など動植物や微生物に対して利用価値の高い栄養分を多量に含有している。^{*6}

母液の有効利用と処理に関しては多くの研究があり、財団法人・クリーン・ジャパン・センター (CJC)^{*8} および最近では野口²⁾ による総説がある。しかしこれらによると、母液は一部飼・肥料化を中心に再利用がはかられているが、発生する母液全量の再資源化には至っていない。

最近、発酵アルコールはその原料が再生産可能なバイオマス資源であることから、石油の代替エネルギーとして注目されている。発酵アルコールが代替エネルギーとして実用化される際には、この母液の再資源化が、さらに重要な課題になると思われる。

一方、微生物フロックは今村・相田³⁾ によりクルマエビ幼生の餌料として開発された人工の有機懸濁物質である。海洋の有機懸濁物質が動物プランクトンなど小型動物の餌料になることは示唆されている。⁴⁾ また微生物フロックは種苗生産用餌料としての幅広い用途の開発が期待されており、⁵⁾ 最近、多賀・安田^{*7,6)} により微生物

^{*1} 発酵母液の再資源化研究-II Studies on the utilization of fermentation slop for aquaculture-II

本研究は、昭和 54・55 年度科学技術庁特別研究促進調整費による「アルコール発酵母液の再資源化に関する総合研究」の一環として行われた。なお本報告の要約は昭和 56 年度日本水産学会秋季大会（三重）で発表した。

^{*2} 工業技術院微生物工業技術研究所 (Fermentation Research Institute, Agency of Industrial Science and Technology, Yatabe-machi, Tsukuba, Ibaraki 305, Japan).

^{*3} 財団法人・クリーン・ジャパン・センター (Clean Japan Center, Toranomon, Minato-ku, Tokyo 105, Japan).

^{*4} 協和醸造工業株式会社 (Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd., Ohtemachi, Chiyoda-ku, Tokyo 100, Japan).

^{*5} 東京大学農学部水産学科 (Department of Fisheries, Faculty of Agriculture, The University of Tokyo, Yayoi-1, Bunkyo-ku, Tokyo 113, Japan).

^{*6} クリーン・ジャパン・センター：再資源化技術の開発状況調査報告（発酵母液編、昭和 52 年度補助事業）、財団法人・クリーン・ジャパン・センター、東京、1978, pp. 1~38.

^{*7} 多賀信夫・安田公昭：瀬戸内海栽培漁業資料、NO. 13, 社団法人・瀬戸内海栽培漁業協会、神戸、1979, pp. 1-45.

フロックに関する基礎的な研究が行われている。

また、母液の水産生物に対する有用性については、クロレラ、アルテミア、ミジンコ、チグリオプスなどの培養に、その効果が認められている^{*1,7)}。母液を原料とした微生物フロックは浮遊性コペポダ、主としてアカルチア *Acartia* の増殖に有効であることが知られている。^{*2)}

グルコースを培養基質とした微生物フロック（グルコース・フロック）はワムシ *Brachionus plicatilis*（ワムシ）に対して餌料効果のあることが報告されている。^{*8,9)} ワムシは、現在種苗生産用の重要な初期餌料となっている。^{5,9,10)}

本研究では、母液の有効利用を目的として、母液を用いた微生物フロックによるワムシの培養を試みた。その結果、自然海水に唯一の有機栄養源として母液を加えて培養形成した微生物フロック（母液フロック）がワムシに対して良好な餌料効果を示したので、さらにこの母液フロックの微生物相、母液フロック構成細菌および酵母の分離、分離菌株の母液資化性、有効餌料菌株の選択などについて検討したので報告する。

実験方法

種母液フロック CJC より 1979 年 12 月分与を受けた、下記条件にて形成した母液フロックを種母液フロックとして以下の実験に使用した（本種母液フロックを用いて培養した母液フロックを以下宇部母液フロックと略称）。

本種母液フロックは、自然海水 100 l（無滅菌の砂戸過海水）に A-AFS 母液（Table 1）1.5 kg、 KH_2PO_4 39 g を加えた仕込み培地、および海水 10 l に A-AFS 母液 233 g、 KH_2PO_4 5.9 g を添加した補給培地を用い、通気量 3 l/100 l·min、30°C、採取率 10% (v/v)/day による半連続培養により形成されたものである。

供試ワムシ 1979 年 12 月 CJC より分譲を受けた体長 200 μm 前後の小型ワムシを使用した。

供試母液 Table 1 に示した主原産地フィリピンの糖蜜を原料とした A-AFS および B-AFS の 2 種類の濃縮母液を用いた（協和醸酵工業・防府工場製）。

使用海水 海水は、協和醸酵工業・宇部工場内厚東川河口域より汲み上げた海水を砂戸過（粒径 2～3 mm, Sand bed 厚さ約 30 cm）した後、カネフィール R-2210（鐘紡合成化学製）により戸過したものを使用した。実験

Table 1. Characteristics of alcohol fermentation slops

		A-AFS*	B-AFS*
COD	(ppm)	361000	375000
Total-N	(ppm)	11200	20000
Total-P	(ppm)	1250	2070
Total solid	(%, w/v)	45.0	64.3
pH		4.8	4.9

* A-AFS and B-AFS: alcohol fermentation slops (concentrated slops).

には、宇部種母液フロックの最初の形成培地（仕込み培地）および渥美母液フロックの形成・培養に用いた海水以外は、この戸過海水を用いた。

母液フロックの培養 培地：仕込み培地は海水 18 l に A-AFS 母液 300 g、 KH_2PO_4 7.5 g および前記「種母液フロック」の宇部母液フロック 2 l を加えたもの、また補給培地（採取率 10% (v/v)/day）は海水 2 l に A-AFS 母液 60 g、 KH_2PO_4 1.5 g を加えたものをそれぞれ用いた。pH はいずれの培地にも無調整とした。培養槽：36 l 容ステンレス製タンク、培養液量 20 l。通気量：散気管（木下式ガラスフィルター、50-4G 粒子 No. 1）で 0.8 l/20 l·min。培養：仕込み培地 20 l を培養槽に入れ、初期 48 時間採取なしで培養、2 日目より毎日 1 回 2 l（採取率 10% (v/v)/day）採取した後、補給培地 2 l を添加し、30°C で半連続培養を行った。供試母液フロックの維持は約 1 カ月間培養を継続した後、新しい培地に仕込み直す継代培養法により行った。

ワムシの培養

1) 培養装置（循環戸過式）

培養槽：50 l ガラス水槽（横 60 cm、縦 29.5 cm、高さ 36 cm、日本水槽工業・NS-6M 型）、培養液量 50 l。戸過装置：戸過材は玉石（平均重量 1.55 g/個、平均容積 0.57 ml/個）、戸過材実容積 830 ml（戸過材槽 横 37 cm、縦 12.5 cm、高さ 7 cm）、培養液量に対する戸過材実容積の比率 1.7% (v/v)、戸過槽の洗浄 2～3 日に 1 回。培養液の循環および通気：循環ポンプ揚水量 10 l/min（揚程 60 cm の押し上げ式渦巻ポンプ）、通気はエアストーン 1 個により 2 l/50 l·min。培養温度：25°C（150W 石英管ヒーター 1 本）。

2) 給餌および培養

培養水槽に供試ワムシを収容し、毎日 1 回 2 l（採取率 4% (v/v)/day）の培養液を採取した後、それと等量の上記母液フロックを投与し、半連続培養を行った。

*1 クリーン・ジャパン・センター：再資源化技術の開発状況調査報告（発酵母液編、昭和 52 年度補助事業）、財団法人・クリーン・ジャパン・センター、東京、1978、pp. 1-38。

*2 安部敏男・今田 克・水原一瓢・平野礼次郎：昭和 54 年度日本水産学会秋季大会（函館）、講演要旨集、p. 8（1979）・日本誌投稿中。

*3 多賀信夫・安田公昭：瀬戸内海栽培漁業資料、NO. 13、社団法人・瀬戸内海栽培漁業協会、神戸、1979、pp. 1-45

ワムシの維持培養は、約1カ月間培養を継続した後、ワムシをプランクトンネット (NXX-17, 69 μ m, 以下ネット) で採取し、海水でよく洗浄した後、新しい培養液に収容する方法を繰返すことにより行った。

フロック量およびワムシ個体数の測定 母液フロック量の測定は Packed cell volume (PCV) を用いた。すなわち一定量のフロック培養液を 5 ml 容目盛付沈殿管 (0~0.1 ml, 目盛 100 等分) に取り、3500 rpm, 15 min 遠心分離後の沈殿物量から求めた。

ワムシ個体数はワムシ培養液 1 ml をプランクトン計数盤に取り実体顕微鏡下で計数した。個体数はこの操作を5回繰返し、その平均値で示した。なお、計数は培養液を抜取り、給餌する前に行った。抱卵率は全ワムシ個体数に対する抱卵ワムシ個体数の比である。

生菌数の測定

1) 試料

宇部母液フロック: 前記「母液フロックの培養」の方法により培養した母液フロック培養液をサンプリング後直ちに測定した (Fig. 3)。渥美母液フロック: CJC より分与されたもので、餌料効果の認められた母液フロック培養液をサンプリング後、5°C にて7日間保存後分析に供した。この渥美母液フロックは、1 m³ 円形タンクに、仕込み培地 1,000 l (B-AFS 母液 (Table 1) 3 kg, KH₂PO₄ 76 g, 海水 560 l, 種母液フロック 440 l) を加え、通気量 25~30 l/1,000 l·min, 攪拌 90 rpm, 30°C にて培養、5日後より抜取り率 30% (v/v)/day による半連続培養により得られたものである。このとき、抜取り後に添加する補給培地は海水 300 l に B-AFS 母液 7 kg, KH₂PO₄ 177.8 g を加えたものを用いた。また培養日令9日目より、補給培地に用いた母液の 1.5% (w/w) 量のイカ肝油乳化液を、1日1回、補給培地添加時に加えた。イカ肝油乳化液は、鶏卵卵黄 100 g に 50 g のイカ肝油 (酸化防止剤としてイカ肝油 180 kg にビタミン E (85%) 450 g を添加) を加え、ホモゲナイザーで乳化

したものである。上記母液フロック培養に用いた海水は、環境生物研究所 (愛知県渥美郡渥美町) にて、地下より汲み上げられた海水を紫外線・オゾン殺菌装置 (セン特殊光源社製・UZX-40K 型) で滅菌したものである。なお、前記渥美母液フロック培養に用いた種母液フロックは、最初に次のような方法で形成された。100 l 容のペンライト水槽に、仕込み培地 100 l (B-AFS 母液 1.5 kg, KH₂PO₄ 38 g, 海水 100 l) を加え、通気量 3 l/100 l·min (エアストーン)、30°C にて2日間培養し、3日目より抜取り率 20% (v/v)/day による半連続培養により形成されたものである。補給培地は海水 20 l に B-AFS 母液 300 g, KH₂PO₄ 7.7 g を加えたものを用いた。本種母液フロックの形成・培養には、前記環境生物研究所にて地下より汲み上げられた比重 1.020 (15°C) の生海水 (無滅菌海水) を用いた。

ワムシ培養液: 前記宇部母液フロックを投与し、前記「ワムシの培養」の方法により培養したワムシ培養液をサンプリング後直ちに測定した (Fig. 3)。

2) 測定法

試料の段階希釈は、試料 2 ml を 75% 滅菌海水 18 ml に加え、試験管振盪機 (Thermo-Mixer, TM-100 型, サーモニクス製) にて1分間振盪した後、その懸濁液を原液として、菌濃度が 10 の倍数になるように調製した。生菌数は Table 2 に示した4種類の分離・計数用平板培地に前記試料の段階希釈液 0.1 ml を BUCK & CLEVERDON 法¹²⁾ により塗抹し、母液フロック試料は 30°C、ワムシ培養液試料は 25°C で 10~12 日間培養した後、出現した微生物コロニー数 (コロニー形成単位, colony-forming units: c.f.u.) を計数し、平板培地3枚の平均値より求めた。

母液フロックからの細菌および酵母の分離 細菌および酵母の分離は、宇部母液フロックおよび渥美母液フロックの試料を塗抹した前記分離・計数培地に出現したコロニーを計数後、釣菌して行い、さらに平板培養法によ

Table 2. Media for isolation and enumeration of bacteria and yeasts

Composition		YMS	KYS	AYMS	Z2216E*2
Glucose	(g)	10.0	4.0	—	Marine Agar 2216E (Difco)
Polypepton	(g)	5.0	—	5.0	
Yeast extract (Difco)	(g)	3.0	4.0	5.0	
Malt extract (Difco)	(g)	3.0	10.0	5.0	
A-AFS*1	(g)	—	—	110	
Sea water	(ml)	750	750	750	
Dist. water	(ml)	250	250	250	
Agar	(g)	20	20	20	
pH		5.0*3	6.5	7.0	

*1 A-AFS: alcohol fermentation slop (Table 1).

*2 Reference, 12).

*3 Liquid medium: pH 4.5.

Table 3. Media for cultivation of isolated bacteria and yeasts

Composition	A-AFSM	B-AFSM
A-AFS* ¹ (g)	220	—
B-AFS* ¹ (g)	—	197
KH ₂ PO ₄ (g)	5.6	5.1
Sea water (ml)	1000	1000
pH* ²	4.3-4.4	4.7-4.8
PCV* ² (% v/v)	3.4	3.9

*¹ A-AFS and B-AFS: alcohol fermentation slops (Table 1).

*² pH and PCV (packed cell volume) were measured, after media were autoclaved at 120°C for 15 min. Solid medium: 2% agar was added to medium, after pH of medium was adjusted to 6.5. PCV means packed volume of insoluble matter in medium.

り純粋分離を行った。純粋分離菌株の保存は、細菌は分離培地 (Z2216E¹²) 又は AYMS, Table 2) の、酵母はすべて YMS 培地 (Table 2) のそれぞれ寒天斜面培地を用いて行った。但し YMS および KYS 培地から分離した細菌は AYMS 培地を使用した。

分離細菌および酵母による母液の資化性

1) 寒天斜面培養

分離菌株の母液資化性は、細菌又は酵母の前記保存培地で 30°C, 3 日間培養した菌体 1 白金耳を Table 3 に示した A-AFSM 寒天斜面培地に接種, 30°C にて 4 ~ 24 日間培養し, その増殖により判定した。

2) 液体振盪培養

種培養: 保存培地と同組成の液体培地 10 ml を含む大型試験管 (25×200 mm) に, 同組成の寒天斜面培地で, 細菌は 30°C, 3 日間, 酵母は 2 日間それぞれ培養した菌体を 1 白金耳接種した後, 30°C で 2 日間振盪培養した (reciprocal shaker, 240 rpm)。以後, この培養液を種培養液として用いた。

本培養: Table 3 に示した A-AFSM 培地 9 ml を分注した大型試験管に上記種培養液 1 ml を植菌し, 30°C で 7 日間培養した。

3) 菌体量の測定

細菌では Dry cell weight (DCW) 法を用いた。すなわち培養液 10 ml を沈殿管 (15 ml 容) に取り, 8000 rpm, 15 分遠心分離して集菌, 10 ml の 3% 食塩水で 1 回洗浄遠心分離した後, 110°C, 2 時間乾燥して秤量した。酵母は前記フロック量の測定法に準じ, PCV 法を用いた。

分離酵母の純培養菌体を餌料に用いたワムシの培養

1) ワムシの培養

(1) 培養装置 (Fig. 1)

培養器: 2 l 容ガラスビーカー, 培養液量 1.4 l。汚過材: 前記玉石, 汚過材実容積 300 ml, 培養液量に対する汚過材実容積の比率 21.4% (v/v)。培養液の循環および

Fig. 1. Apparatus for cultivation of rotifer.

A: air pump, B: air tube, C: air lift pipe (i.d. 13 mm), D: circulating filter, Volume of culture medium: 1.4 l.

通気: ビーカー中央部に設置した内径 13 mm, 高さ 121 mm のアクリル製パイプによるエアリフト・ポンプ, 通気 0.5 l/1.4 l·min。培養温度: 25°C (恒温室)。

(2) ワムシの接種

種ワムシは, 「前記ワムシの培養」の方法で培養したワムシ (母液フロック・ワムシ) をネットで採取し, 下記の汚過滅菌海水 (滅菌海水) でよく洗浄した後, 一定量の滅菌海水に懸濁収容して調製した。培養ビーカーに約 1,000 ml の滅菌海水を分注した後, ワムシ個体密度 15 ~ 30 individuals (ind.)/ml になるように種ワムシ懸濁液 200 ml を接種し, さらに滅菌海水を加え, 全量を 1,400 ml とした。

(3) 給餌および培養

培養ビーカーより, 毎日 15 ml の培養液を抜取った後 (抜取り率 1.1% (v/v)/day, 下記 3) の方法で調製した分離菌の培養菌体 (0.25 ml, PCV) 又はパン酵母 (0.25 g, wet) を 15 ml の滅菌海水に懸濁して投与し, 10 日間半連続培養を行った。

(4) ワムシの計数

培養ビーカー中央部の表層, 中層および下層より培養液 5 ml ずつ計 15 ml を採取し, 前記の方法に準じて計数した。

(5) 汚過滅菌海水

比重 1.0214 (21.8°C, 赤沼式比重計, No. 2504-AA, 離合社製) の海水をミリポア・フィルター (GS-pore size 0.22 μm) により汚過滅菌したものを用いた。

2) 分離酵母の培養

母液を唯一の有機栄養源とする A-AFSM 培地 (Table 3) 90 ml を含んだ三角フラスコに, 前記「分離細菌および酵母による母液の資化性」の方法による種培養液 10 ml を接種, 30°C にて 2 日間振盪培養した。この培養フ

Fig. 2. Apparatus for cultivation of rotifer.

A: air pump, B: air tube, C: air lift pipe (i.d. 14 mm), D: recirculating filter, E: air bubbling outlet, Volume of culture medium: 25 l.

ラスコから餌料菌体調製用試料として 70 ml の培養液を抜取った後、新しい同組成の培地 70 ml を補給する fill-and-draw 法による半連続培養を 10 日間行った。

3) 餌料菌体の調製

投与菌体量 (0.25 ml, PCV) は、培養液 PCV 値より同条件で振盪した菌無接種の対照培地の PCV 値 (培地中の不溶性固形分の Packed volume) を差引いた値、すなわち純菌体量 PCV 値として求めた。純菌体量 0.25 ml (PCV) に相当する培養液を 3,500 rpm, 15 分間遠心分離して集菌した後、20 ml の滅菌海水で 2 回洗浄遠心分離を行った。この洗浄菌体を滅菌海水 15 ml に懸濁して投与した。

母液フロック菌体は前記「母液フロックの培養」の方法で培養した母液フロック培養液 (培養日令, 6~15 日) を用いて上記同様に調製した。またパン酵母 (協和醸造工業製, 製造日より 10 日以内の製品) は 0.25 g (wet) を滅菌海水 15 ml に懸濁して投与した。

分離酵母の純培養液を餌料に用いたワムシの培養

1) ワムシの培養

(1) 培養装置 (循環ろ過式, Fig. 2)

培養槽: 25 l ガラス水槽 (横 45 cm, 縦 21.5 cm, 高さ 30 cm), 培養液量 25 l。ろ過装置: ろ過材 前記玉石, ろ過材実容積 600 ml (ろ過材槽 横 29.5 cm, 縦 9.0 cm, 高さ 6.5 cm), 培養液量に対するろ過材実容積の比率 2.4% (v/v)。ろ過槽の洗浄は 2~3 日に 1 回。培養液の循環および通気: 揚水量 3.9 l/min (エアリフト管 2 本・内径 14 mm, エアリフト管 1 本への通気量・3 l/min), 通気はエアストーン 1 個にて 1 l/25 l・min。培養温度: 25°C (恒温室)。

(2) ワムシの接種

ワムシ個体密度 50~100 ind./ml になるように、母液フロック・ワムシを前記同様に採取、海水で洗浄後、

海水 2 l に懸濁し、培養槽に収容した。

(3) 給餌および培養

ワムシ槽より毎日 1 回 1 l の培養液を抜取った後 (抜取り率 4% (v/v)/day, 培養日令 1~2 日), 下記 2) の方法で培養した酵母純培養液 100 ml と海水 900 ml を、また母液フロック給餌の場合は、母液フロック培養液 1 l を、それぞれ投与し 11 日間半連続培養を行った。抜取り率 8% (v/v)/day (培養日令 3~10 日) のときは、上記条件の倍量のものを用いた。

なお給餌量は、投与培養液の培養に要した母液量がいずれも等しくなるように設定した。

2) 分離酵母の純培養および母液フロックの培養

(1) 分離酵母の純培養

B-AFSM 培地 (Table 3) 270 ml を分注した 2 l 容三角フラスコ (培養液量 300 ml) に、前記「分離細菌および酵母による母液の資化性」の方法による種培養液 (YMS 培地, Table 2) 30 ml を接種し、30°C で 2 日間振盪培養した。この培養フラスコから 200 又は 210 ml の培養液を抜取った後、同組成の培地を抜取り量だけ補給する前記方法にて 10~12 日間半連続培養を行った。

(2) 母液フロックの培養

仕込み培地は Table 3 に示した B-AFSM 培地組成の 1/10 濃度の培地を使用した。また補給培地は仕込み培地と同組成のものを用いた。

10% (v/v) の種字母液フロックを含む上記仕込み培地 10 l を 20 l 容ステンレス製タンクに入れ、通気量 0.4 l/10 l・min, 30°C にて培養、最初に抜取り率 10% (v/v)/day (培養日令 2~5 日) とし、フロック生成量の増加にしたがって抜取り率 20% (v/v)/day (培養日令 6~13 日) と多くして半連続培養を行った。ワムシ槽への投与は培養日令 3 日目より開始した。

結 果

母液フロックによるワムシの培養 最初に母液フロックのワムシに対する餌料効果を検討した。母液フロックおよび母液フロックを投与したワムシの培養経過をFig. 3に示した。なお、ワムシ培養の初期(日令0~2日)において、試験1ではパン酵母と海産クロレラを、また試験2では母液フロックと海産クロレラを併用した餌料を用いたが、それ以後はすべて母液フロックのみを餌料とした。なお、餌料としての母液フロックは、試験1で

Fig. 3. Growth of rotifer fed on microbial floc produced from alcohol fermentation slop.

Microbial floc cultivation (Flock): basal medium (A-AFS (Table 1) 300 g, KH_2PO_4 7.5 g, microbial floc's seed 2 l, sea water 18 l)/36-l tank; supplemented medium (A-AFS 60 g, KH_2PO_4 1.5 g, sea water 2 l); air flow, 0.8 l/min; 30°C; drawing rate of culture broth, 10%(v/v)/day (cultivation time, 2-28 days at experiment 1 (●) and 2-32 days at experiment 2 (○)); packed cell volume, 3000 rpm/15 min (●). Rotifer cultivation (Rotifer): 50 l of culture medium/aquarium; air flow, 2 l/min; recirculating rate of culture medium, 10 l/min; 25°C; drawing rate of culture broth, 4%(v/v)/day (cultivation time, 2-28 days at experiment 1 (●) and 1-29 days at experiment 2 (○)). amount of feed, 2 l of microbial floc/day; ↓, feed not supplied. Sampling: for isolation and enumeration of bacteria and yeasts in culture broth of microbial floc and rotifer.

は母液フロック培養日令2日目のものから、試験2ではその3日目のものからそれぞれ投与した。

母液フロックの pH は、培養2日目で 4.6~4.7 に低下し、以後試験1, 2とも 4.5~4.6 で安定に維持された。フロック生成量は、試験1では培養9日目に、試験2では5日目に PCV 0.7% になり、以後はほぼ 0.7~1.0% を維持し、最高 1.1% に達した。なお、試験1の場合のみ、PCV は 3,000 rpm/15 min にて求めた。

次に上記母液フロックを餌料としたワムシの培養経過であるが、試験1では、培養7日目でワムシ個体密度 130 ind./ml と培養2日目の約4倍に増殖し、最高 193 ind./ml に達した。試験2では、培養4日目で培養開始時の約2倍の 252 ind./ml になり、以後約 230 ind./ml 以上を維持し、最高 384 ind./ml まで増殖した。抱卵率は試験1で平均 23% (培養日令2~29日)、試験2で平均 26% (日令0~30日)であった。抱卵率の高いときは 40~50% になり良好な増殖をもたらしたが、無給餌日の翌日、翌々日などは 10% 前後に低下し、ワムシ数も減少した。ワムシ槽の pH は、ほぼ 7.6~7.9 に維持され大きな変動はみられなかった。

以上より、母液フロックはワムシに対して有効な餌料であることが認められた。また母液フロックのみを餌料として約8カ月間ワムシを培養維持することができた。

母液フロック槽およびワムシ槽内の生菌数 母液フロ

Table 4. Viable counts of microorganisms in culture broth of microbial flocks and rotifer

Media*2	Viable counts (c.f.u./ml)*1		
	Microbial flocks		Rotifer*5
	Ube*3	Atsumi*4	
Z2216E (Bacteria)	1.8×10^9	1.2×10^9	2.2×10^8
YMS (Yeasts)	8.6×10^8	1.8×10^7	2.5×10^6
KYS	3.0×10^9	—	2.4×10^7
AYMS	1.6×10^9	6.5×10^8	1.6×10^7

*1 c.f.u.: colony-forming units.

*2 Media: Table 2.

*3 Ube microbial floc: culture broth incubated with medium containing A-AFS (Table 1) for 17 days at 30°C. pH and packed cell volume of the culture broth were 4.5 and 0.87% (v/v), respectively. Sampling: Fig. 3. Colony counts: 30°C, 11 days.

*4 Atsumi microbial floc: culture broth incubated with medium containing B-AFS (Table 1) for 34 days at 30°C. pH and packed cell volume of the culture broth were 4.6 and 1.00% (v/v), respectively. Colony counts: 30°C, 10 days.

*5 Rotifer: rotifer culture broth incubated using Ube microbial floc*3 as food for 18 days at 25°C. pH and rotifer density of the culture broth were 7.7 and 152 individuals/ml, respectively. Sampling: Fig. 3. Colony counts: 25°C, 12 days.

Fig. 4. Optical micrograph of microbial flock produced from alcohol fermentation slop.

Sample: culture broth incubated with 1/10 (B-AFSM) medium (Table 3) at 30°C for 18 days. pH and packed cell volume of the culture broth were 4.6 and 1.0%, respectively. Magnification: 100×10 (Gram stain).

ック槽およびワムシ槽内の微生物相を明らかにするため、最初に Table 2 に示した 4 種類の分離・計数培地、すなわち細菌用としては Z2216E 培地、酵母用としては YMS, KYS 培地および母液を添加した AYMS 培地を用いて生菌数を調べた。各培養槽内の生菌数を Table 4 に示した。

生菌数の多く得られた培地は Z2216E, KYS, AYMS 培地であったが、コロニー形態および分離菌の細胞形態から、KYS, AYMS 培地には細菌と酵母が多く混ざって出現した。しかし細菌用 Z2216E 培地および酵母用 YMS 培地に生成したコロニーは、ほとんど前者は細菌、後者は酵母であった。従って Z2216E および YMS 培地で得られた生菌数を細菌数および酵母数として以下検討した。

母液フロック槽内の生菌数は、細菌が $10^8 \sim 10^9$ c.f.u./ml, 酵母が $10^7 \sim 10^8$ c.f.u./ml であり、酵母数はいずれの試料においても細菌数の 1/10 程度であった。また Fig. 4 に宇部母液フロックの顕微鏡写真を示したが、生菌数の結果と同様に細菌数が酵母数より多いことが観察された。渥美母液フロックの生菌数が宇部母液フロックのそれに比較し、細菌数、酵母数とも少ないのは、培養日令、試料送付、保存などの影響によることも考えられる。

ワムシ槽内の細菌数は 10^8 c.f.u./ml, 酵母数は 10^8 c.f.u./ml であり、酵母数は細菌数の約 1/100 であった。母液フロック槽とワムシ槽内の生菌数を比較すると、ワムシ槽内の細菌数は前者の約 1/10, 酵母数は前者の約 1/300 とワムシ槽では酵母数が細菌数より著しく少ないことが認められた。しかしワムシ槽内の酵母生菌数は、ワムシ培養日令 18 日においても 10^8 c.f.u./ml を維持していた。

Table 5. Growth of isolated bacteria on agar slant medium containing alcohol fermentation slop as sole source of carbon and energy

Isolated strains	Growth*				
	1	2	4	7	24 (days)
ZU-1	—	—	+	+	+++
ZU-2	—	—	—	+	+++
ZU-4W	—	—	—	—	+++
ZU-4Y	—	—	+	++	+++
YU-3	—	—	+	++	+++
YU-5	—	—	—	—	+
KU-4	—	—	—	—	—
AU-1	—	—	—	+	+++
AU-2	—	+	++	++	+++
AU-3	—	—	+	++	+++
ZA-1	—	—	—	—	+++
ZA-4	—	—	—	—	—
YA-1	—	+	++	++	++
AA-1	+	++	++	++	+++
AA-2	—	+	++	++	+++
AA-4	—	—	—	++	+++

* Growth: +++, more abundant growth; ++, abundant growth; +, moderate growth; —, scanty growth; —, none growth.

Cultivation: A-AFSM medium (Table 3), 30°C.

Table 6. Growth of isolated yeasts on agar slant medium containing alcohol fermentation slop as sole source of carbon and energy

Isolated strains	Growth*		
	1	2	4 (days)
YU-1	+	+++	+++
KU-1	+	+++	+++
AU-6L	+++	+++	+++
ZA-3	+++	+++	+++
YA-2	+++	+++	+++
YA-3	+++	+++	+++
AA-3	+++	+++	+++
AA-5	+++	+++	+++

* Growth: Table 5.

Cultivation: A-AFSM medium (Table 3), 30°C.

母液フロックからの細菌および酵母の分離 ワムシに対して餌料効果の認められた前記 2 種の母液フロックから 4 種類の培地 (Table 2) を用いて細菌 16 菌株、酵母 8 菌株を純粋分離した。最初に分離平板培養から釣菌したコロニーの中には、生育不良又は継代培養のできない菌株が含まれていた。このように分離しにくい菌株はコロニー径 1.0 mm 以下の微小コロニーに多くみられた。

分離細菌および酵母による母液の資化性 分離細菌 16 菌株および酵母 8 菌株を用いて母液の資化性を検討した。最初に母液を唯一の有機栄養源とする A-AFSM 培地 (Table 3) を用いて寒天斜面培養により検討した。

Fig. 5. Effect of pH on insoluble matter in medium containing alcohol fermentation slop. pH of medium (A-AFSM, Table 3) was adjusted with 1 N HCl or 1 N NaOH, after medium was autoclaved at 120°C for 15 min. Packed cell volume means packed volume of insoluble matter in medium.

その結果を Table 5, 6 に示した。細菌の多くは、培養 7 日で scanty~moderate growth であり、酵母に比べ増殖が著しく遅く、中には生育しない菌株もみられた (Table 5)。しかし資化性を有する細菌の多くは約 3 週間の培養で, abundant growth を示した。また母液資化性細菌の中には、斜面培地の表面でなくむしろ下層部でよく増殖する菌株がみられた。これらの細菌と比較して、酵母はいずれも増殖が速く、培養 2 日目で abundant growth を示した (Table 6)。

次に、上記寒天斜面培養において増殖が認められた菌株について、液体振盪培養を用いて母液資化性を調べた。酵母菌体量は PCV 法で求めたが、母液培地中には (Table 3 に示したように 3~4% の不溶性固形分が含まれており、この量は pH により変化した (Fig. 5)。不溶性固形分は pH 4.0~6.0 ではほとんど変わらないが、pH 6.5 以上になると急激に増加した。従ってこの PCV 法は pH 6.0 以下では十分使用できるが、常に培養液の pH を測定する必要があった。

Fig. 6. Assimilation of alcohol fermentation slop by isolated bacteria.

Cultivation: 10 ml of A-AFSM medium (Table 3)/test tube (25×200 mm), 30°C, reciprocal shaker (240 rpm). Cont.: control medium (non-inoculum). YA-3: strain of isolated yeast.

細菌は Fig. 6 にみられるように、その DCW は対照培地のそれとほとんど差がなく、いずれの菌株も強い母液資化性は認められなかった。

しかし酵母は Fig. 7 に示したように、いずれも寒天斜面培養の結果と同様に強い母液資化性が認められた。最も資化性の強い菌株は YA-3, AA-3 および AA-5 菌株であり、培養 1~3 日で PCV 6.3~6.8%, 次で良好な菌株は AU-6L, ZA-3 および YA-2 菌株で PCV 5.3~5.6%, 次で YU-1 および KU-1 菌株で PCV 4.2~4.7% であった。また培養液の pH は 5~6 を示し、増殖に伴い上昇した。

なお、分離酵母 8 菌株はコロニー形態により、「YU-1 菌株」、「KU-1 菌株」、「AU-6L, ZA-3, YA-2 菌株」および「YA-3, AA-3, AA-5 菌株」の 4 グループに分けることができるが、このグループと母液の資化性パターンがよく一致した。

さらに、資化性の強い酵母 YA-3 菌株と寒天斜面培養で増殖の認められた細菌 AA-2 菌株を用いて、培養の経時変化を調べ、その結果を Fig. 8 に示した。これ

Fig. 7. Assimilation of alcohol fermentation slop by isolated yeasts.

Cultivation: 10 ml of A-AFSM medium (Table 3)/test tube (25×200 mm), 30°C, reciprocal shaker (240 rpm). Cont.: control medium (non-inoculum).

Fig. 8. Time course of culture of isolated bacterium and yeast in alcohol fermentation slop.

Cultivation: 10 ml of A-AFSM medium (Table 3)/test tube (25×200 mm), reciprocal shaker (240 rpm). ●: YA-3 strain of isolated yeast, ▲: AA-2 strain of isolated bacterium, ○: control (non-inoculum medium).

なお投与純菌体量 0.25 ml (PCV) を集菌するのに要培養開始時 DCW の約 2 倍に増殖, 培養液 pH も 4.3 から 5.6 に上昇し, 強い母液資化性を示した。しかし細

菌 AA-2 菌株は DCW 11~13 mg/ml, pH 4.3~4.4 を示し対照培地のそれと大差なく, このような好氣的振盪培養では酵母のような強い母液資化性はみられなかった。

有効餌料酵母の選択 分離細菌は強い母液資化性を示さなかったため, 母液資化能の強い分離酵母から至適餌料菌株の選択を試みた。

1) 分離酵母の純培養菌体を餌料に用いたワムシの培養

母液資化性の認められた酵母 8 菌株の純培養菌体を餌料に用いてワムシ培養を行った結果を Fig. 9 に示した。

分離酵母はいずれも餌料効果を示し, 培養 5~8 日でワムシ個体数は培養開始時の 5~13 倍に増加, 宇部母液フロック分離菌株では YU-1 菌株 (最高ワムシ個体密度 294 ind./ml) が, 渥美母液フロック分離菌株では ZA-3 菌株 (214 ind./ml) が最も良好であった。また YA-3 菌株 (189 ind./ml), YA-2 菌株 (188 ind./ml), KU-1 菌株 (165 ind./ml), AA-3 菌株 (142 ind./ml), および AA-5 菌株 (128 ind./ml) は, いずれもパン酵母 (125 ind./ml) よりすぐれていた。しかし母液フロックはパン酵母よりも悪く, 最高ワムシ個体密度は 60 ind./ml で培養開始時の約 3 倍の増殖にとどまり, 分離酵母のような顕著な餌料効果は認められなかった。

Fig. 9. Growth of rotifer fed on cells of isolated yeasts cultured with alcohol fermentation slop.

Isolated yeasts cultivation: 100 ml of A-AFSM medium (Table 3)/500-ml Erlenmeyer flask, 30°C, 10 days, semi-continuous culture by rotary shaker (180 rpm), once two day 70 ml of the culture broth was drawn from the flask, and a volume of the medium equal to that of removed culture broth was supplied. Microbial flock cultivation: cultural conditions are same as that described for Fig. 3, the microbial flocks cultured for 6-15 days were used as feed for rotifer. Rotifer cultivation (Fig. 1): 1.4 l of medium/2-l beaker; air flow, 0.5 l/min; 25°C; 10 days; drawing rate of culture broth, 1.1% (v/v)/day; amount of feed, 0.25 ml of packed cell volume of isolated yeasts or microbial flock/day, 0.25 g (wet) of bakers' yeast/day. (A): strains of yeasts isolated from Ube microbial flock. (B): strains of yeasts isolated from Atsumi microbial flock.

Fig. 10. Growth of rotifer fed on culture broth of isolated yeasts cultured with alcohol fermentation slop.

Isolated yeasts cultivation: 300 ml of B-AFSM medium (Table 3)/2-l Erlenmeyer flask; 30°C; 10–12 days; semicontinuous culture by rotary shaker (180 rpm); once two day 200 ml or 210 ml of culture broth were drawn from the flask, and a volume of the medium equal to that of removed culture broth was supplied. Microbial flock cultivation: 10 l of 1/10 (B-AFSM) medium/20-l tank; supplemented medium is same as above medium; air flow, 0.4 l/min; 30°C; drawing rate of culture broth, 10% (v/v)/day (cultivation time, 2–5 days) or 20% (v/v)/day (cultivation time, 6–13 days); the microbial flocks cultured for 3–13 days were used as feed for rotifer. Rotifer cultivation (Fig. 2): 25 l of culture medium/aquarium; air flow, 1 l/min; recirculating rate of culture medium, 3.9 l/min (the air volume supplied to each air left pipe, was 3 l/min); 25°C; drawing rate of culture broth, 4% (v/v)/day (cultivation time, 1–2 days) or 8% (v/v)/day (cultivation time, 3–10 days); amount of feed, 100 ml (rotifer cultivation time, 1–2 days) or 200 ml (rotifer cultivation time, 3–10 days) of culture broth of isolated yeasts/day, 1 l (rotifer cultivation time, 1–2 days) or 2 l (rotifer cultivation time, 3–10 days) of culture broth of microbial flock/day. ●: YA-3 strain, ▲: ZA-3 strain, ■: YU-1 strain, ○: microbial flock. ↑: washing-day of recirculating filter. Eggs (%): (Number of rotifers with eggs/Total number of rotifers) × 100.

より酵母 YA-3 菌株は培養 3 日で DCW 24 mg/ml とした平均培養液量とその培養液の平均 PCV (投餌回数 10 回の平均値, ワムシ培養日令 0~9 日) は, YU-1 菌株 19 ml (PCV 5.12%), KU-1 菌株 22 ml (4.97%), AU-6L 菌株 12 ml (5.54%), ZA-3 菌株 15 ml (5.23%), YA-2 菌株 14 ml (5.25%), YA-3 菌株 11 ml (5.89%), AA-3 菌株 10 ml (5.97%), AA-5 菌株 11 ml (5.72%) および母液フロック 43 ml (0.77%) であった。また, 純菌体量を求めるための対照培地 PCV 値は, 宇部母液フロック分離酵母試験の場合, A-AFSM 培地で平均 3.49%, 母液フロック培地で 0.18%, さらに渥美母液フロック分離酵母試験の場合, A-AFSM 培地で平均 3.44% であった。

餌料効果の顕著であった上記 4 菌株のうち, YA-3 菌株が最も強い母液資化性を示した。至適餌料菌株を選択するためには, 餌料効果と共に餌料菌株の母液資化性をも考慮する必要がある, また現場での省力化という観点から, 次に母液培養液そのものを餌料に用いてワムシ培養を行った。

2) 分離酵母の純培養液を餌料に用いたワムシの培養
上記菌体投与により顕著な餌料効果を示した YU-1, YA-3 および ZA-3 菌株について, 母液培養液そのものを餌料に用いて検討した。Fig. 10 に示したように酵母の培養液投与区は, いずれも菌体投与の結果 (Fig. 9) と同様にすぐれた餌料効果を示した。そして平均ワムシ個体密度 (培養日令 3~11 日) は, YU-1 菌株で 234 ind./ml, YA-3 菌株で 260 ind./ml および ZA-3 菌株で 311 ind./ml であった。中でも, ZA-3 菌株が最も良好であり, 培養 6 日以後はワムシ個体密度約 350 ind./ml 以上を維持し, 最高 394 ind./ml に達した。

なお, 餌料に用いた培養液の平均 PCV 値および平均 pH (投餌回数 11 回の平均値, ワムシ培養日令 0~10 日) は, YU-1 菌株 5.11% (pH 5.4), YA-3 菌株 6.53% (6.5), ZA-3 菌株 5.80% (5.6) および母液フロック 0.89% (4.6) であった。

また母液フロックは, その菌体投与 (Fig. 9) ではあまり餌料効果を示さなかったが, 培養液投与では培養 6 日以後ワムシ個体密度約 200 ind./ml 以上を維持し, 酵母培養液投与区に近い増殖が認められた (Fig. 10)。

考 察

現在, ワムシの大量培養には, 主として海産クロレラとパン酵母類を併用した餌料が用いられている。^{*1} 微生物フロックを餌料としたワムシの培養は, 多賀・安田^{*2,3)}

*1 北島力: 昭和 57 年度日本水産学会秋季大会 (広島), 講演要旨集, p. 180 (1982).

*2 多賀信夫・安田公昭: 瀬戸内海栽培漁業資料, NO. 13, 社団法人・瀬戸内海栽培漁業協会, 神戸, 1979, pp. 1-45.

による、500 l の大量培養槽を用いた報告があるのみである。

最初に沿岸自然海水で形成した母液フロックのワムシに対する餌料効果を検討した結果、母液フロックはすぐれた餌料効果を示した (Fig. 3)。グルコース・フロックではその餌料効果が時折変動すると報告されている。^{*2} しかし母液フロックでは実験例によって若干そのような傾向がみられるときもあったが、(Fig. 3)、多くの場合、培養開始 4～6 日後にはワムシ個体密度約 200 ind./ml 以上を安定に維持した。

母液フロックの微生物相を知るため、母液フロック槽内の生菌数を調べた結果、細菌は酵母数の 10 倍程度多く認められた (Table 4)。また顕微鏡観察においても酵母より細菌個体数が多くみられた (Fig. 4)。CJC 報告書^{*2}では、母液フロックの生菌数は、培養日数の長いフロック (日令 22 日) では、酵母 (10^9 c.f.u./ml) が主体となっているが、培養日数の短いフロック (日令 9 日) では細菌 (10^7 c.f.u./ml) が主体となっていると報告している。しかし前者の顕微鏡観察では酵母よりも細菌個体数が多く認められている。グルコース・フロック中においても、同様に生菌数又は全菌数 (直接検鏡法) のいずれの場合も、酵母数より細菌数が 10 倍程度多く観察されている。^{*1,3)}

細菌および酵母の細胞 1 個当たりの体積は、細胞を球体として細菌 *Escherichia coli* で $0.52 \mu\text{m}^3$ 、酵母 *Saccharomyces cerevisiae* で $110 \mu\text{m}^3$ と計算されている¹³⁾。この値と Table 4 の生菌数から母液フロック中の細菌および酵母の菌体体積量を求めると、細菌は $6.2 \times 10^7 \sim 9.4 \times 10^8 \mu\text{m}^3/\text{ml}$ 、酵母は $2.0 \times 10^9 \sim 9.5 \times 10^{10} \mu\text{m}^3/\text{ml}$ であった。

以上より母液フロック中の微生物の数では、細菌は酵母数の 10 倍程度多く認められたが、微生物の菌体体積量としては、酵母は細菌の約 100 倍になる。

母液フロックを投与したワムシ槽の生菌数では、酵母は、さらに少なく細菌数の 1/100 程度であった。しかしワムシ槽で日令 18 日においても、酵母の生菌数が 10^9 c.f.u./ml 維持されていた。これは、大沢・川野^{*3}が海洋酵母を餌料としたときのすぐれた特徴として指摘しているように、残餌死菌によるワムシ培養液の汚染を防止する上から重要であると思われる。

母液フロックから分離した細菌および酵母の母液資化性を検討した結果、細菌は寒天斜面培養において酵母よ

り著しく増殖が遅く、好氣的振盪培養でも強い増殖を示さなかった (Fig. 6, 8, Table 5)。しかし酵母はいずれの培養法を用いても強い母液資化性を示した (Fig. 7, 8, Table 6)。

分離酵母の好氣的純培養では、いずれの菌株においても培養液の pH は増殖に伴って 5～6 に上昇した (Fig. 7, 8)。母液フロック構成細菌の中には、母液フロックのグラム染色でグラム陽性桿菌がみられること、また斜面培養でやや嫌氣的な培地下層部でよく増殖することなどから、有機酸を生成する属種の細菌が存在するものと考えられる。またグルコース・フロックの場合、フロック槽内における急速な pH の降下は、微生物が添加したグルコースを分解して酸を生成するためと推察されている。^{*1,4)}

これらのことから、フロック槽の低 pH 維持 (Fig. 3) は酵母よりむしろ細菌に起因していると思われる。しかしフロック槽への通気条件と好氣的振盪培養条件はかなり違うので、分離酵母について前者の条件で有機酸生成を今後検討すると共に、低 pH 維持に寄与している母液成分を明らかにする必要がある。このフロック槽の低 pH 環境は酵母の増殖に適し、且つ雑菌混入の防止にもなっている。従ってこれは安定したフロック培養を行うための重要な条件である。

母液フロックから分離した酵母のワムシに対する餌料効果を調べた結果、菌体又は培養液のいずれを餌料に用いても、すぐれた効果が認められた (Fig. 9, 10)。

母液フロックの菌体投与では、酵母のような著しい餌料効果はみられなかったが (Fig. 9)、その培養液投与では、酵母培養液投与区に近い効果を示した。

今後の問題として、開放系における母液フロックの培養では、餌料効果の高い微生物相を有する母液フロックを安定に生産することが最も重要である。しかし自然海水を用いて形成した微生物フロックは環境要因や季節によって微生物相が変動し不安定であることが指摘されている。^{1*} 従って目的とする母液フロックを安定且つ大量に生産するためには、母液フロックの微生物相やそれらのフロックを構成している微生物間の相互作用などを明らかにし、母液フロックへの有効微生物の組込み、又は有効微生物のみによる母液フロックの再構成などを検討する必要がある。

さらに投与細菌は、ワムシ槽の有機物の分解や硝化作

*1 多賀信夫・安田公昭：瀬戸内海栽培漁業資料，NO. 13，社団法人・瀬戸内海栽培漁業協会，神戸，1979，pp. 1-45.

*2 クリーン・ジャパン・センター：再資源化技術の開発状況調査報告（発酵母液編，昭和 53 年度補助事業），財団法人クリーン・ジャパン・センター，東京，1979，pp. 1-165.

*3 大沢岳義・川野隆嗣：海洋開発，4，80-87 (1971)

用の促進など安定なワムシ培養の水質維持に,* またワムシの増殖率低下の原因となる色素生産菌の増殖や *Vibrio* sp. の異常増殖を抑制する作用もあると推察されている。¹⁴⁾ これらのことから、今後は餌料としての細菌と共に、フロック槽およびワムシ槽の安定な微生物相や水質維持に関与する細菌の働きを解明する必要がある。

また、母液フロック投与によりワムシ槽に持込まれる母液成分の微生物分解過程を調べると共に、ワムシ採取後の培養残液の処理方法をも検討する必要がある。

以上の結果より、母液フロックは海産クロレラのように自然条件に左右されず、安定且つ大量に、経済的廉価に供給できる稚仔魚用餌料プランクトンの新しい餌料として期待できると共に、母液の再資源化にも寄与できると思われる。

また、最近 YOSHIDA & HOSHII¹⁵⁾ は、排水処理の副産物である活性汚泥などの有効利用をはかるため、これを動物プランクトンの餌料にして、そのプランクトンを家畜の飼料にする間接的利用法を試みている。そして微生物を餌料に用いて培養したワムシの栄養価を調べた結果、養鶏用飼料資源として有望であると報告している。

以上のことから、自然環境で営まれている溶存有機物(母液、有機性排水)-有機懸濁物質(微生物フロック、活性汚泥)-小動物(動物プランクトン)という食物連鎖を技術的に応用することは、資源の有効利用という観点から今後ますます重要であると考えられる。

要 約

1) 母液フロックはワムシに対して良好な餌料効果を示し、ワムシ個体密度約 200 ind./ml 以上(最高 384 ind./ml)を約 1 カ月間維持した。母液フロック培養液の pH は培養開始後 2 日目に 4.6~4.7 に低下し、以後はほぼその値を安定に維持した。フロック生成量は培養日令 5~9 日ではば一定の値となり、それ以後は PCV 0.7~1.0% を維持した。なお母液フロックを唯一の餌料として約 8 カ月間ワムシを培養維持することができた。

2) 母液フロック槽内の生菌数は、細菌が $10^8 \sim 10^9$ c.f.u./ml、酵母が $10^7 \sim 10^8$ c.f.u./ml、また母液フロックを投与したワムシ槽内のそれは、細菌が 10^8 c.f.u./ml、酵母が 10^6 c.f.u./ml であった。いずれの培養槽内においても細菌数が酵母数より多く認められた。

3) 餌料効果の認められた母液フロックから分離した細菌 16 菌株、酵母 8 菌株の母液資化性を検討した結果、寒天斜面培養を用いた場合、細菌は酵母より著しく

増殖が遅く、中には生育しない菌株もみられた。また細菌は好氣的振盪培養においても強い母液資化性を示さなかった。しかし酵母はいずれの培養法を用いても強い母液資化性が認められた。

4) 有効餌料菌株を選択するため、分離酵母 8 菌株についてワムシに対する餌料効果を検討した。母液で培養した菌体および母液培養液のいずれを餌料に用いても餌料効果が認められ、特に YU-1, YA-3 および ZA-3 菌株が良好な餌料効果を示した。

5) そして、純培養液を餌料に用いた場合の平均ワムシ個体密度(培養日令 3~11 日)は YU-1 菌株で 234 ind./ml, YA-3 菌株で 260 ind./ml および ZA-3 菌株で 311 ind./ml であった。中でも ZA-3 菌株が最も良好であり、最高ワムシ個体密度 394 ind./ml に達した。なおこれらの菌株は、菌体投与の場合、パン酵母よりすぐれていた。

6) 以上より、母液フロックは、海産クロレラのように自然条件に左右されず、安定且つ大量廉価に供給できる稚仔魚用餌料プランクトンの新しい餌料として期待できると共に、母液の再資源化にも寄与できるものと思われる。

本研究の遂行にあたり、終始ご指導を賜った東京大学海洋研究所多賀信夫教授、および実験にご協力いただいた協和醸酵工業株式会社土浦工場関口良三氏に心から感謝の意を表します。

文 献

- 1) 野口貞夫: 発酵と工業, **39**, 700-707, (1981).
- 2) 今村茂生・植田拓治: 栽培技研, **1**, 35-46 (1972).
- 3) E. R. BAYLOR and W. H. SUTCLIFFE: *Limnol. Oceanogr.*, **8**, 369-371 (1963).
- 4) R. W. SHELDON, T. P. T. EVELYN, and T. R. PARSON: *Limnol. Oceanogr.*, **12**, 367-375 (1967).
- 5) 平野礼次郎: 海洋の微小生物—その開発と利用(科学技術庁資源調査所資料), 恒星社厚生閣, 東京, 1975, pp. 162-181.
- 6) K. YASUDA and N. TAGA: *La mer*, **18**, 17-22 (1980).
- 7) 寺本賢一郎・河盛好昭: 水産増殖, **27**, 191-194 (1980).
- 8) 安田公昭・多賀信夫: 日水誌, **46**, 933-939 (1980).
- 9) J. H. RYTHER and J. C. GOLDMAN: *Ann. Rev. Microbiol.*, **29**, 429-433 (1975).
- 10) 代田昭彦: 水産餌料生物学, 恒星社厚生閣, 東京, 1975, pp. 403-493.

* 多賀信夫・安田公昭: 瀬戸内海栽培漁業資料, NO. 13, 社団法人・瀬戸内海栽培漁業協会, 神戸, 1979, pp. 1-45.

- 11) J. D. BUCK and R. C. CLEVERDON: *Limnol. Oceanogr.* **5**, 78-80 (1960).
- 12) C. H. OPPENHEIMER and C. E. ZOBELL: *J. Mar. Res.*, **11**, 10-18 (1952).
- 13) C. LAMANNA, M. F. MALLETTE, and L. N. ZIMMERMAN: *Basic Bacteriology, Its Biological and Chemical Background*, 4th ed., Williams and Wilkins, Baltimore, 1973, pp. 66-71
- 14) 安田公昭: 海産動物の種苗生産過程における餌料としての海洋細菌の有効性, 博士論文, 東京大学, 1979, pp. 111-133.
- 15) M. YOSHIDA and H. HOSHI: *Japan. Poultry Sci.*, **15**, 64-68 (1978).