

植え継ぎ培養法とケモスタット式間引き培養法で生産したシオミズツボウムシのヒラメ仔魚に対する餌料価値

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 公開日: 2025-06-25 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 友田, 努, 小磯, 雅彦, 手塚, 信弘, 島, 康洋 メールアドレス: 所属:
URL	https://fra.repo.nii.ac.jp/records/2014795

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



植え継ぎ培養法とケモスタット式間引き培養法で生産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

友田 努^{*1}・小磯雅彦^{*1}・手塚信弘^{*1}・島 康洋^{*2}

(*1 能登島栽培漁業センター, *2 瀬戸内海区水産研究所伯方島栽培技術開発センター)

魚類および甲殻類の初期餌料として用いられている海産ワムシ類の培養技術は飛躍的に発展し、多様な培養法が開発された^{1,2)}。これらにより、近年は計画的な安定生産が可能になり、量的確保の問題はほぼ解決された。さらに、質的問題となるワムシの栄養価についても、これまでに仔稚魚を対象とした様々な栄養学的な研究が行われており^{3,4)}、ワムシの活性⁵⁾に着目した研究も進められつつある。しかし、ワムシの培養法と仔魚の飼育成績との関連に着目した研究は見当たらない。

本研究では、粗放連続培養²⁾の変則型として近年普及しつつあるケモスタット式間引き培養法^{2,6)}と植え継ぎ培養法^{2,5)}で生産したシオミズツボワムシ *Brachionus plicatilis* sp. complex (以下、ワムシ)を栄養強化し、ヒラメ *Paralichthys olivaceus* 仔魚への給餌効果を比較した。その結果、ワムシの餌料価値に関する新たな知見と問題点が得られたので、報告する。

材料と方法

試験区の設定 試験区には、植え継ぎ培養における対数増殖初期(培養開始2日目;以下BC-E区)、同後期(同4日目,以下BC-L区)およびケモスタット式間引き培養における定常状態(安定連続培養期,以下CTC区)のワムシをヒラメ仔魚に給餌する3区を設定し、各試験区とも3水槽ずつ、合計9水槽を設けた。

ワムシの培養 上記の培養法が異なるワムシ(L型小浜株,背甲長 $242 \pm 20 \mu\text{m}$)を準備するために、500ℓポリカーボネイト水槽5基では植え継ぎ培養を、20ℓコンクリート水槽1基ではケモスタット式間引き培養(毎日収穫,連続給餌,連続注水)を行った。培養水には、砂濾過海水と淡水を混合した60%稀釈海水を用い、培養水温は20℃とした。餌料には、市販の濃縮淡水クロレラ(生クロレラV12;クロレラ工業)とパン酵母(オリエンタルイースト;オリエンタル酵母工業)を用いた。植え継ぎ培養では、濃縮淡水クロレラをワムシ1億個体当たり500ml/日の割合で1日2回に分けて給餌した。ケモスタット式間引き培養では、ワムシ個体数に関係なく濃縮淡水クロレラとパン

酵母をそれぞれ一定量(3.0ℓ/日,および1.5kg/日)混合し、定量ポンプ(EH-B10;IWAKI)で24時間連続給餌した。

ワムシの栄養強化 ワムシの栄養強化は、80%稀釈海水を満たした100ℓポリカーボネイト水槽6基で行った。栄養強化剤にはマイクロカプセル油脂を含有した濃縮淡水クロレラ(生クロレラω3;クロレラ工業)を用い、ワムシ1億個体当たり200ml/日の割合で培養水に添加した。強化開始時のワムシ接種密度は300個体/ml,強化水温は20℃とした。強化時間は、6時間と17時間の2種類のワムシを準備した。

ワムシの観察 ワムシ活性の指標値として、試験に用いたワムシについては培養期間中のワムシ個体数、日間増殖率および総卵率を、栄養強化後のワムシについては強化水槽内のワムシ個体数および総卵率を算出した。日間増殖率と総卵率の算出は既報⁵⁾に準じた。

ヒラメの飼育 試験には、2005年5月17日に宮古栽培漁業センターで採卵されたヒラメ受精卵(受精率99.2%,64-128細胞期95.2%)を翌18日に能登島栽培漁業センターに搬入し(搬入時水温16.3℃,胚体形成期100%),200ℓアルテミアふ化水槽でふ化させて用いた。ふ化まで水温17℃前後,換水率20回転/日,通気量300ml/分で卵管理した。ふ化は5月20日に完了し、ふ化仔魚の大きさは体長 $3.05 \pm 0.20\text{mm}$ (n=30),ふ化率は72.5%であった。ヒラメ仔魚の飼育は、5月20日から6月9日までの20日間行った。飼育には500ℓポリカーボネイト水槽を用い、収容尾数は5,000尾(容積法)とした。飼育水温は3.2kwヒートポンプを用いて、17℃前後に調温した。0~18日齢の間、飼育水槽には濃縮淡水クロレラ(スーパー生クロレラV12;クロレラ工業)を50~100万細胞/mlの細胞濃度となるように1日2回(9,16時)添加した。2~19日齢の間、餌料はワムシのみを1日2回(9,16時)給餌した。飼育水中のワムシ密度は、2日齢に4個体/ml,3~6日齢に5個体/ml,7~8日齢に6個体/ml,9~12日齢に7個体/ml,13~15日齢に8個体/ml,16~17日齢に9個体/ml,および18~19日齢に10個体/mlを維持した。換水率は100~300%/日とし、通気はエアストーン(MA-30,アース)1個を用いて弱通気(450~500ml/分)とした。

結 果

ヒラメ仔魚の成長と発育段階の観察 サンプルとして、全水槽からふ化直後より5日齢ごとに仔魚を無作為抽出した。抽出したサンプルはメタアミノ安息香酸エチルメタンスルホン酸塩（三共）を用いて麻醉後、5%ホルマリン海水で固定し、後日30尾について体長の測定と発育段階の観察を行った。体長はデジタルマイクロスコープ（VHX-100F；KEYENCE）により0.01mmの精度で測定した。発育段階の区分は、南⁷⁾の示す形態変化の過程に準じ、5段階（ステージA-E）に区分した。

ヒラメ仔魚の生残尾数の推定 飼育試験終了時に仔魚を全数取り上げ、その約1/10量に当たる尾数を計数し、重量法によって推定した。

栄養強化ワムシとヒラメ仔魚の脂肪酸分析 脂肪酸分析用のサンプルとして、ワムシについては試験区ごとに6時間および17時間栄養強化したものを試験期間中に3回、ヒラメ仔魚についてはふ化時および飼育試験終了時に全水槽からそれぞれ採取した。各サンプルとも湿重量で20g前後を採取し、淡水でよく洗浄した後、水分を十分に切りビニール袋に入れて-80℃で凍結保存し、後日、分析に供した。サンプルは凍結乾燥した後、Folch *et. al.*⁸⁾の方法により総脂質を抽出した。脂肪酸は常法によりケン化・メチル化した後、ガスクロマトグラフ（GC-14A, FID付；島津製作所）で分離して組成比を求め、荒川ら⁹⁾に準拠し、総脂質含量に各脂肪酸の組成比を乗じて定量した。分析条件として、カラムはULBON HR-SS-10（50m × 0.25mm, 信和化工）、キャリアーガスはヘリウム（2.5 ml/min）を用い、スプリット比は1:100、温度は注入口250℃、カラム150~220℃（昇温3℃/min）、検出器270℃とした。

ワムシの活性と栄養価 植え継ぎ培養において、ワムシ個体数は278.6個体/ml（培養開始時）から1,258.2個体/ml（培養4日目）まで対数増殖を示し、日間増殖率は培養3日目で最高値（52.0%）に達した。一方、ケモスタット式間引き培養ではワムシ個体数が135.7個体/mlに維持される定常状態を示し、日間増殖率は52.3%となった。試験に用いたワムシの日間増殖率および総卵率は全区とも高いレベルを維持することができ、ほぼ同等であった。栄養強化後のワムシ個体数および総卵率はBC-E区が高く、CTC, BC-L区間においてはほぼ同等であった（表1）。また、栄養強化後のEPA, DHA および n-3 HUFA 含量はCTC区がBC-E, BC-L区よりも有意に高くなった（表2）。さらに、体色発現との関連性が報告されているEPA / ARA比¹⁰⁾もCTC区がBC-E, BC-L区よりも有意に高くなった。

ヒラメの飼育成績 飼育水槽内の水質および餌料環境は全区ともほぼ同等であった（表3）。また、ヒラメ仔魚のワムシ摂餌個体率も92.2~100.0%であり、試験期間中を通して差は認められなかった。BC-E, BC-L区では成長と生残に差は見られず、良好な飼育成績であった。CTC区では9日齢に2水槽で、13日齢には残りの1水槽で色素産生菌が発生し、17日齢には3水槽の内1水槽が全数死亡した（写真1）。また、CTC区は5日齢時点で発育の遅れが見られ、飼育経過に伴いBC-E, BC-Lの2区との間で成長差が顕著に広がった（図1, 表4）。一方、ヒラメ仔魚の魚体中のEPA, DHA および n-3 HUFA 含量に差は見られなかったものの、脂肪酸充足度の指標値とされる

表1 ワムシの活性

試験区	試験に用いたワムシ			6時間強化後のワムシ		17時間強化後のワムシ	
	ワムシ密度* ¹ (個体/ml)	日間増殖率 (%)	総卵率 (%)	ワムシ密度* ² (個体/ml)	総卵率 (%)	ワムシ密度* ² (個体/ml)	総卵率 (%)
BC-E	592.4±66.9	50.0±13.1a	67.0±7.9a	283.3±29.5a	68.9±9.0a	363.9±26.8a	38.3±5.7b
BC-L	1,258.2±150.0	40.4±9.7b	48.5±7.0b	261.1±23.2b	53.7±8.2b	292.2±42.1b	36.8±4.4b
CTC	135.7±13.4	52.3±17.7a	52.9±7.8b	264.0±24.7b	55.0±9.6b	288.2±30.8b	44.5±7.7a

データは平均値±標準偏差 (n=20-22)

*1: 培養水槽から収穫時のワムシ密度

*2: 栄養強化後のワムシ密度, 強化開始時は300個体/ml

a>b: p<0.05 (Fisher's PLSD法)

表2 栄養強化ワムシの脂肪酸組成 (乾物重量)

強化時間	試験区	EPA (g/100g)	DHA (g/100g)	n-3 HUFA (g/100g)	EPA/ARA 比	18:1/n-3 HUFA 比
6時間	BC-E	0.39±0.03b	0.46±0.05b	0.94±0.08b	4.45±0.53b	0.61±0.07b
	BC-L	0.40±0.02b	0.45±0.03b	0.95±0.06b	3.45±0.51c	0.56±0.02b
	CTC	0.65±0.02a	0.65±0.06a	1.41±0.09a	9.29±0.03a	1.05±0.06a
17時間	BC-E	0.52±0.10b	0.52±0.08b	1.17±0.19b	6.13±1.58b	0.59±0.07b
	BC-L	0.48±0.03b	0.52±0.03b	1.12±0.07b	4.44±0.28b	0.59±0.02b
	CTC	0.71±0.12a	0.74±0.08a	1.58±0.15a	10.67±1.77a	1.04±0.05a

データは全て3検体の平均値±標準偏差
a>b : p<0.05 (Fisher's PLSD法)

表3 ヒラメ仔魚の飼育環境

試験区	水温 (°C)	pH	酸素飽和度 (%)	クロレラ濃度*1 (万cells/ml)	ワムシ密度	
					7時 (個体/ml)	15時 (個体/ml)
BC-E	17.3	8.03	93.7	19.6	3.4	3.6
	(16.2-18.5)	(8.00-8.08)	(90.5-97.8)	(3-75)	(0.8-7.2)	(1.8-7.6)
BC-L	17.3	8.05	92.9	19.5	3.4	4.0
	(16.2-18.5)	(8.01-8.09)	(89.2-97.2)	(3-75)	(0.8-5.2)	(2.0-6.8)
CTC	17.2	8.04	93.0	19.6	3.0	3.8
	(16.2-18.5)	(8.01-8.10)	(89.0-98.6)	(8-50)	(0.7-5.8)	(1.8-6.2)

*1 : スーパー生クロレラV12 (クロレラ工業)

p<0.05 (カイニ乗検定)

p<0.0001 (カイニ乗検定)

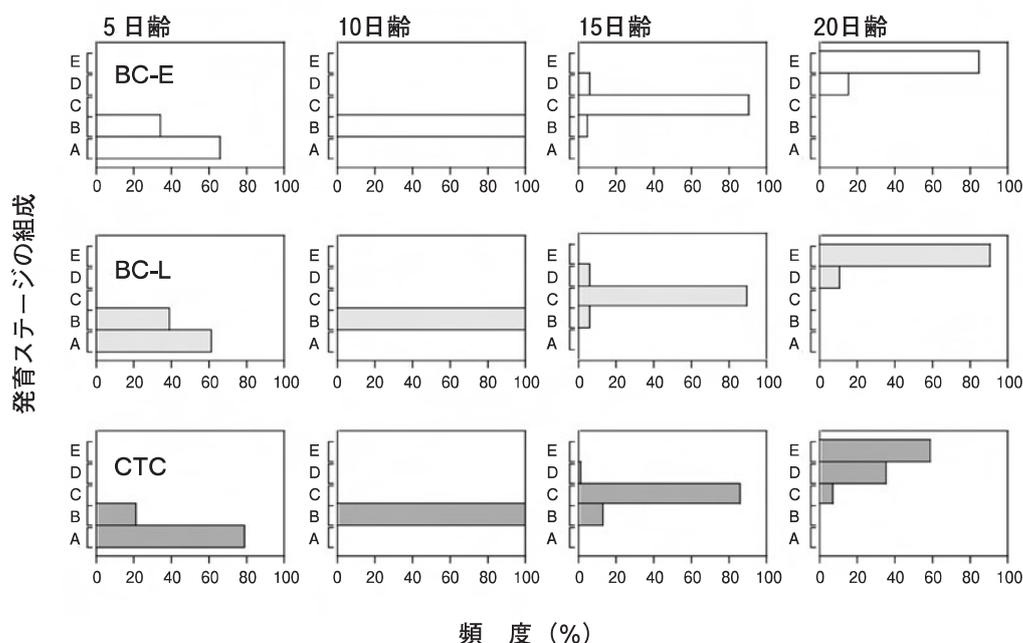
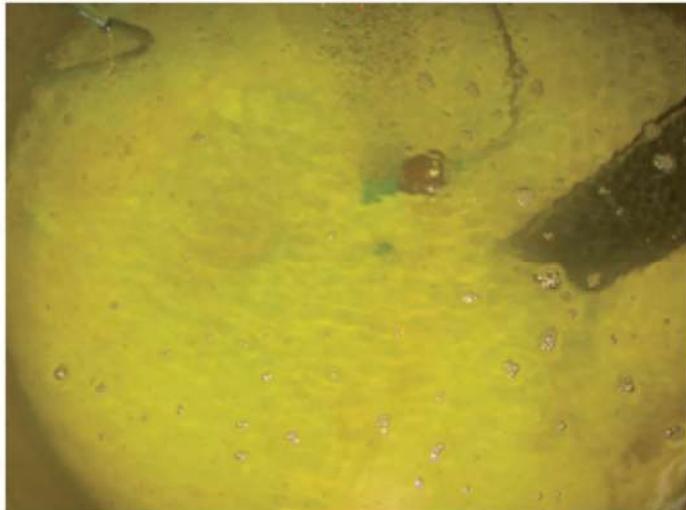


図1 培養法の異なるワムシを与えたヒラメ仔魚の発育過程
(BC-E, L区, 植え継ぎ培養, CTC区; ケモスタット式間引き培養)



BC-E 区



BC-L 区



CTC 区

写真1 培養法の異なるワムシを与えたヒラメ飼育水槽
(BC-E, L 区, 植え継ぎ培養, CTC 区; ケモスタット式間引き培養)

表4 ヒラメ仔魚の飼育結果

試験区	体長* ¹ (mm)				生残率* ² (%)
	5日齢	10日齢	15日齢	20日齢	
BC-E	3.44±0.17	4.88±0.30	6.54±0.44a	7.92±0.42a	96.0±2.7
BC-L	3.42±0.17	4.94±0.28a	6.52±0.41a	7.96±0.40a	92.5±5.8
CTC	3.42±0.18	4.80±0.31b	6.08±0.46b	7.40±0.44b	62.7±54.3

*1: 平均値±標準偏差 (n=90), 20日齢CTC区のみ (n=60)

*2: 3水槽の平均値±標準偏差

a>b: $p < 0.05$ (Fisher's PLSD法)

表5 ふ化時および20日齢ヒラメ仔魚の脂肪酸組成 (乾物重量)

日齢	試験区	EPA (g/100g)	DHA (g/100g)	n-3 HUFA (g/100g)	EPA/ARA 比	18:1/n-3 HUFA 比
0	-	2.99	4.48	8.48	4.02	0.46
	BC-E	1.34±0.04	3.12±0.01	5.24±0.07	4.92±2.21	0.21±0.00
20	BC-L	1.44±0.13	3.45±0.32	5.71±0.51	3.86±2.42	0.20±0.00
	CTC	1.34	3.23	5.24	3.14	0.32

データは3水槽の平均値±標準偏差

ふ化時 (0日齢) は1検体, 20日齢CTC区は2水槽の平均値

18:1/n-3 HUFA 比¹¹⁾ は CTC 区が BC-E, BC-L 区よりも高くなった (表5)。

考 察

本試験において、全区のワムシとも対数増殖期であるにもかかわらず、CTC 区ワムシの EPA, DHA および n-3 HUFA 含量は BC-E, BC-L 区よりも有意に高かった。一因として、ケモスタット式間引き培養では、培養水の希釈により水質が良好に維持されること、連続給餌¹²⁾により過剰な餌料密度や飢餓の影響¹³⁾および溶存酸素濃度の急激な低下の影響¹⁴⁾を排除できることが利点に挙げられ、本培養結果が良好であったことは上記のことから理解できる。一方、植え継ぎ培養では、対数増殖初期には摂餌機能の未熟なふ化直後の仔虫¹⁵⁾が個体群の中に占める割合が高いこと、対数増殖後期には同初期に比べて日間増殖率が低下しているため (表1)、既に環境抵抗の影響^{15,16)}を受けていることが考えられる。また、植え継ぎ培養では培養期間中において収穫時期が制限される⁵⁾のに対して、ケモスタット式間引き培養では収穫適期が持続されていた (表1, 2)。このことから、ケモスタット式

間引き培養により生産されるワムシの餌料価値は現状の種苗生産において有効と考えられる植え継ぎ培養の対数増殖期のワムシ⁵⁾よりも優れていることが示唆される。

一方、本試験における CTC 区ワムシの高い栄養価はヒラメの飼育成績に全く反映されず、仔魚の成長停滞と大量死亡をもたらした (図1, 表4)。本結果は、ケモスタット式間引き培養ワムシの給餌を介した色素産生菌の混入に起因するものと考えられ (写真1)、本培養法により生産されるワムシは増殖特性と高度不飽和脂肪酸の蓄積能の優位性 (良好さ) に反して、初期餌料としての清浄性の面においては不安定要素を抱えていること^{17,18)}が示唆された。

ケモスタット式間引き培養は、高い増殖率によりワムシを安定確保でき、保有水槽数やフィルター洗浄の作業量も少なく、大幅な省力化が可能である⁶⁾。また、高度不飽和脂肪酸の蓄積能が優れたワムシを効率的に生産するという観点からすると、植え継ぎ培養⁵⁾よりも優れていると考えられる (表2)。しかし、植え継ぎ培養や培養水槽と収穫水槽の2面を構える従来型の粗放連続培養²⁾から収穫されるワムシに比べ、培養の長期化に伴い水槽底面の腐敗および有害細菌^{19,20)}、原

生動物²¹⁾、カビ^{22,23)}やウイルス²³⁾増加の影響を受けやすいため、最終的には培養不調や種苗生産成績の不良¹⁷⁾に陥りやすい。その一因として、ケモスタット式間引き培養は毎日の収穫作業後には水槽内の水深が浅くなるため、必然的に培養水の攪拌効率が低下し餌料が水槽底面に沈降しやすくなることが挙げられる。これは、培養水槽が収穫水槽を兼ねているが故の欠点であると考えられる。本試験でCTC区に発生した色素産生菌(写真1)は、過去に報告されているワムシ培養不調を引き起こす菌株²⁰⁾とは性状が異なるものと考えられるが、ヒラメ仔魚の成長・生残に対しては顕著な悪影響を及ぼした(表4, 図1)。ワムシが感染源として疑われるウイルス性および細菌性疾患はこれまでも報告されており^{23,24)}、マダラ種苗生産においてもワムシ体表に付着するカビ状の微小原生動物が原因とされる仔魚の大量死亡も確認されている¹⁷⁾。今後、防疫的な見地から培養法別の細菌調査等も必要と考えられる。

一方で、上記のような不安定要素は、培養管理の不備に起因する面が大きいと考えられる。培養が比較的容易で培養期間の長期化が可能な粗放連続培養やケモスタット式間引き培養は、簡便かつ省力的であるが故に防疫面における日常管理が手薄に成りがちである。その対策として、①日常的な消毒作業の徹底(培養水槽, 収穫水槽, 餌料供給水槽, 培養水, 注水配管, 給餌配管, 収穫配管, 通気配管), ②培養水槽内への汚濁負荷の軽減(適正通気による餌料の沈降防止, 適正給餌による餌料の劣化防止, 糞や死骸等の除去, 低密度培養, 低温培養, 定期的な植え替え, 貝化石の散布), および③接種・供給前におけるワムシ洗浄作業の徹底が一例として挙げられる。

近年、ワムシの株や培養環境が仔魚の成長・生残を左右する因子となり得ることが強く指摘されている²⁵⁾。すなわち、種苗生産を行う上で健全な種苗を飼育するためには、量的確保と省力化を目指した効率的なワムシ培養のみではなく、清浄性(いわゆる、病原体フリー)を前提条件とした質的安定化を常に考慮しておくことが重要と考える。

文 献

- 1) Fu Y, Hada A, Yamashita T, Yoshida Y, Hino A (1997) Development of a continuous culture system for stable mass production of the marine rotifer *Brachionus*. *Hydrobiologia*, **358**, 145-151.
- 2) 桑田 博 (2000) II 大量培養. 「海産ワムシ類の培養ガイドブック」(栽培漁業技術シリーズ No.6), (社)日本栽培漁業協会, 43-117.
- 3) Watanabe T, Kitajima C, Fujita S (1983) Nutritional values of live organisms used in Japan for mass propagation of fish : a review. *Aquaculture*, **34**, 115-143.
- 4) Takeuchi T (2001) A review of feed development for early life stages of marine finfish in Japan. *Aquaculture*, **200**, 203-222.
- 5) 友田 努, 小磯雅彦, 陳 昭能, 竹内俊郎 (2006) 増殖ステージが異なるワムシを摂餌したヒラメ仔魚の発育と形態異常の出現. *日水誌*, **72**, 725-733.
- 6) 奥村重信, 岩本明雄 (2006) ワムシの連続注水間引き培養法と植え継ぎ培養法の比較. *栽培漁業センター技報*, **5**, 43-45.
- 7) 南 卓志 (1982) ヒラメの初期生活史. *日水誌*, **48**, 1581-1588.
- 8) Folch J, Lees M, Stanley GHS (1957) A simple method for the isolation and purification of total lipid from animal tissues. *J. Biol. Chem.*, **226**, 497-509.
- 9) 荒川敏久, 石崎靖朗, 中田 久, 清水 健, 有元 操, 竹内俊郎 (2002) 飼育および天然ブリ稚魚の脂質組成および脂肪酸組成の比較. *日水誌*, **68**, 374-381.
- 10) Estevez A, McEvoy LA, Bell JG, Sargent JR (1999) Growth, survival, lipid composition and pigmentation of turbot (*Scophthalmus maximus*) larvae fed live-prey enriched in arachidonic and eicosapentaenoic acids. *Aquaculture*, **180**, 321-343.
- 11) Furuita H, Takeuchi T, Watanabe T, Fujimoto H, Sekiya S, Imaizumi K (1996) Requirements of larval yellowtail for eicosapentaenoic acid, docosahexaenoic acid, and n-3 highly unsaturated fatty acid. *Fish. Sci.*, **62**, 372-379.
- 12) 小磯雅彦, 友田 努, 桑田 博, 日野明德 (2005) 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*, **32**, 1-4.
- 13) 小磯雅彦, 桑田 博, 日野明德 (2005) 短時間の飢餓がシオミズツボワムシの生残, 発達, 生物学的最小形および卵の大きさに及ぼす影響. *水産増殖*, **53**, 1-5.
- 14) 小磯雅彦, 日野明德 (2006) シオミズツボワムシの増殖および摂餌に対する溶存酸素濃度の急激な低下の影響. *水産増殖*, **54**, 37-41.
- 15) 小磯雅彦, 日野明德 (1999) 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*,

- 47, 249-256.
- 16) 小磯雅彦, 日野明德 (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**, 197-204.
 - 17) 久門一紀 (2003) 3. 冷水性魚類の早期種苗生産技術開発 (マダラ). 平成14年度日本栽培漁業協会事業年報, (社)日本栽培漁業協会, 109-110.
 - 18) 小磯雅彦 (2007) ワムシ培養に関するアンケート調査結果 (2006年度). 栽培技研, **35**, 63-71.
 - 19) Yu JP, Hino A, Noguchi T, Wakabayashi H (1990) Toxicity of *Vibrio alginolyticus* on the survival of the rotifer *Brachionus plicatilis*. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **56**, 1455-1460.
 - 20) Maeda M, Hino A (1991) Environmental management for mass culture of the rotifer, *Brachionus plicatilis* in 'Rotifer and micro algae culture system' (ed. by W. Fulks and K. L. Main). The Oceanic Institute, Honolulu, 125-133.
 - 21) Cheng SH, Suzuki T, Hino A (1997) Lethality of heliozoon *Oxnerella maritima* on the rotifer *Brachionus rotundiformis*. *Fish. Sci.*, **63**, 543-546.
 - 22) Nakamura K, Hatai K (1994) *Atkinsiella parasitica* sp. nov. isolated from a rotifer, *Brachionus plicatilis*. *Mycoscience*, **35**, 383-389.
 - 23) Comps M, Menu B (1997) Infectious diseases affecting mass production of the marine rotifer *Brachionus plicatilis*. *Hydrobiologia*, **358**, 179-183.
 - 24) 室賀清邦 (1995) 海産魚介類の仔稚におけるウイルス性および細菌性疾病. 魚病研究, **30**, 71-85.
 - 25) 萩原篤志 (2002) 海産魚の初期餌料: 餌料生物ワムシの生物機能と種苗生産への応用. 水産増殖, **50**, 473-478.