

冷凍濃縮クロレラを使用したワムシ培養について

Culture of the Rotifer *Brachionus Plicatiris* Using
the Frozen Condensed Chlorella

早乙女 浩 一

(日本栽培漁業協会能登島事業場)

1. はじめに

魚類の種苗生産技術は、近年飛躍的に向上し、魚種によっては、1機関当たり百万単位の生産も可能となっている。これは、餌料としての動物プランクトンの大量培養技術の開発、特に、シオミズツボワムシの培養技術の向上によるところが大きい。

伊藤(1960)によって導入されたシオミズツボワムシ(以下ワムシ)は、クロレラ等の藻類を餌料とすることにより、種苗生産時の餌料として広く用いられるようになった。その後、種苗生産規模の増大と共に、ワムシの必要量も増加したため、新たなワムシ餌料として、パン酵母(平田, 森1967)、油脂酵母(今田他 1979)、微生物フロック(安田, 多賀 1980, 東原他 1983)、テトラセルミス(岡内, 福所 1984)等の利用が試みられた。このうち、パン酵母、油脂酵母については量産規模での使用が一般化しており、特に前者については、ほとんど全ての種苗生産機関で使用されている。しかし、パン酵母単独で培養したワムシを使用した場合、稚仔魚の大量へい死を招く場合があること(藤田 1975)、その原因が高度不飽和脂肪酸(ω 3 H U F A)の欠乏にあること(渡辺他 1978)、さらにその対策として、パン酵母とクロレラの併用培養、油脂酵母の利用(北島他 1980)、クロレラによる二次強化(北島他 1979)等が示され、クロレラはワムシ培養時の餌料として欠くことができないものとなった。

一方、このような技術開発の結果、種苗生産の対象となる魚種が多様化し、初期餌料であるワムシの使用量も大幅に増加したため、その量的確保と餌料となるクロレラの安定供給が大きな問題となっている。

日栽協上浦事業場では、クロレラの量的な不足に対処するために、大型の遠心分離機を導入し、濃縮保存したクロレラをワムシ培養に使用した(日栽協 1983)。能登島事業場でも、対象魚種の産卵期がクロレラの増殖率の低い冬期間に集中しているため、ワムシ培養に必要なクロレラを確保することが困難な状況にあった。そこで、クロレラ培養に余裕のある期間にクロレラを大量に培養し、遠心分離濃縮して冷凍保存することにより、量的不足に対応する事を試みたので、その結果を報告する。

2. 冷凍濃縮クロレラ(冷凍クロレラ)の製造と保存

図1にクロレラの濃縮工程を示した。1,500~3,000万セル/mlの濃度となったクロレラ原液を、ポンプを使用して1次濃縮機に送り込み、3,000万~1億セルの濃度に濃縮する。この1次濃縮液を、更に二次濃縮機に送り、最終的に200~600億セル/mlまで濃縮する。この時の濃度については、濃縮液の排出間

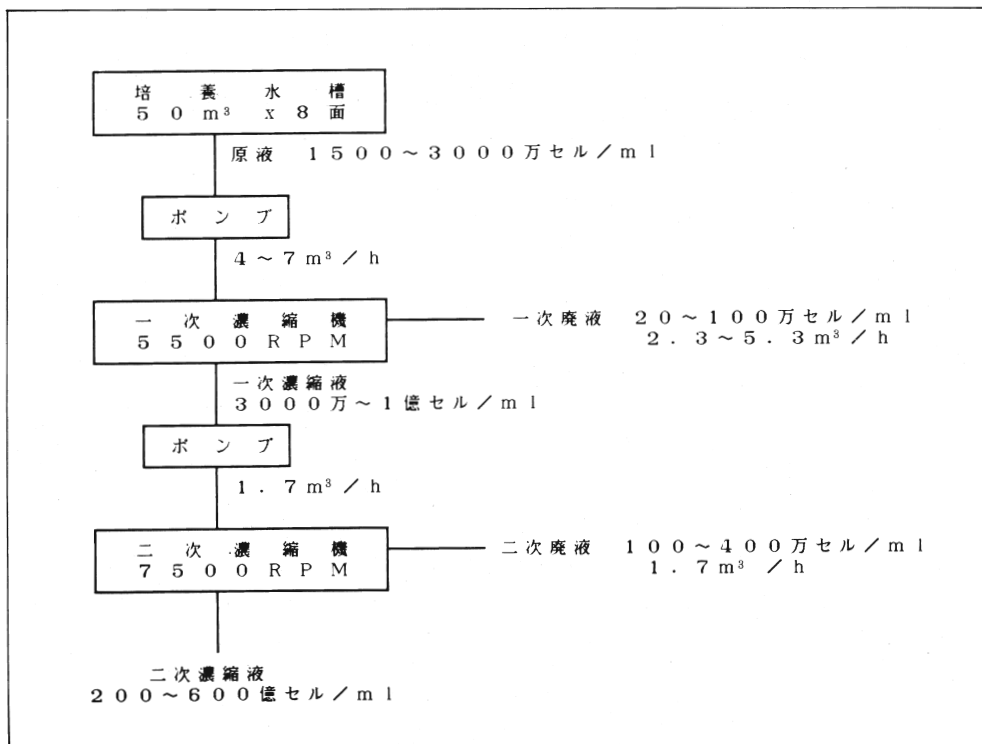


図1 クロレラの濃縮工程

隔の設定により任意に調節可能である。

濃縮処理能力は、原液の濃度によって左右されるが、ほぼ4～7 m³/時であり、1日8時間の連続運転を行った場合、30～50 m³（培養水槽1面分に相当）の処理が可能である。

濃縮したクロレラは、用途に応じ冷凍庫（-45℃）又は冷蔵庫（5℃）に保存する。冷蔵庫内で保存した場合、6ヶ月程度は培養時の元種として再生が可能である。冷凍したものは、再生の可能性が低いためそのままワムシの餌料として使用する。

3. 冷凍クロレラの栄養組成

餌料を長期に渡って保存した場合その栄養組成の変化が問題となる。この点について、日裁協上浦事業場で行った分析結果（日裁協1984）を表1に示した。

濃縮したクロレラを、-70～80℃で急速凍結した後、-30℃の冷凍庫に保存した場合、及び、冷凍庫内で数時間をかけて凍結しそのまま保存した場合についての栄養組成の変化を0、3、6、8ヶ月後について分析した。

冷凍処理前の ω 3高度不飽和脂肪酸（ ω 3 H U F A）含有率は、28.2%であり、この値は、8ヶ月の保存の後でも29.1%、28.8%と酸化による減少は見られなかった。又、クロレラの冷凍方法についても、-70～80℃の急速凍結と、-30℃での緩慢凍結処理との差は見られなかった。

表1 冷凍クロレラの一般組成と脂肪酸組成

処理方法	未処理 クロレラ	急速冷凍クロレラ(-70~80℃で10分間)				緩慢冷凍クロレラ(-30℃で数時間)			
		0ヶ月	3ヶ月	6ヶ月	8ヶ月	0ヶ月	3ヶ月	6ヶ月	8ヶ月
一般組成									
水分	68.4	68.7	69.5			68.8	68.9		
蛋白質	15.9	15.8	15.3			15.8	15.7		
糖質	6.1	6.0	6.2			6.0	5.8		
灰分	2.3	2.3	2.3			2.2	2.4		
脂質	7.3	7.2	6.7	7.5	7.3	7.2	7.2	7.5	8.0
脂肪酸									
14:0	4.8	4.8	4.0	5.0	4.8	4.6	3.1	4.8	4.8
16:0	15.5	15.9	16.1	15.5	15.2	15.6	16.4	15.3	14.8
16:1	35.5	35.6	33.2	35.7	35.6	35.1	25.8	35.6	35.0
16:2						0.1			
18:0	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.4	0.2	0.2
18:1	4.7	4.7	5.0	4.5	4.6	4.6	6.7	4.6	4.5
18:2 ω 6	0.1	2.2	2.3	2.3	2.3	2.4	2.4	2.3	2.3
18:3 ω 3	0.1	0.2		0.4		0.8			
18:4 ω 3									
20:1									
20:2									
20:3 ω 3	3.8	4.3	4.2	3.6	3.9	4.4	5.3	3.8	3.9
20:4 ω 3			0.4	0.4			1.1	1.1	
20:4 ω 6	0.2	0.3				0.1			
20:5 ω 3	28.2	27.4	28.8	26.5	29.1	27.1	28.5	27.2	28.8
20:5 ω 6									
22:1				1.2					
22:2				0.8	0.6			0.9	0.8
22:4 ω 3							0.6		
22:5 ω 3							0.2		
22:6 ω 3				0.2					
$\Sigma \omega 3$ (20:3 <)	28.2	27.4	29.2	27.1	29.1	27.1	30.4	28.3	28.8

日裁協 上浦事業場の分析結果による

4. 冷凍クロレラのワムシ培養への利用

ワムシ培養時にクロレラを使用するのは、稚仔魚への投餌前の栄養強化素材とするものと、培養時の餌料の2通りである。冷凍クロレラについても、この両面について利用の可能性を検討した。

(1) 冷凍クロレラで二次強化したワムシの栄養組成

冷凍クロレラを使用して、ワムシの二次強化を行った場合の栄養組成について、前項と同じく上浦事業場の分析結果を表2に示した。

ワムシ密度を500個体/mlとし、2,000万セル/mlの冷凍クロレラで12時間処理した場合、 $\omega 3$ H U F Aは40%増加した。これは、培養したクロレラ（以下生クロレラ）を使用した場合とほぼ同じ数字であることから、冷凍クロレラはワムシの二次強化用素材として十分利用可能であると考えられる。

(2) 培養の餌料としての利用効果

能登島事業場において、冷凍クロレラの使用を開始したのは昭和58年度からである。このうち、58年度については、試行錯誤的な面が強く利用の可能性の検討にとどまった。59年度より事業的規模での利用を開始し、60年度には、冬期ワムシ生産におけるクロレラ使用量の50%以上を、冷凍クロレラ

で賄うことを目標とした。以下に60年度のワムシ生産の概要と具体的培養事例により、冷凍クロレラの利用状況を示す。

1) 培養方法

① 元 種

培養に使用する元種は0.5m³元種水槽3面で維持した。0.5m³水槽は、加温、冷却により、水温を16～20℃に保ち、高水温時のS型ワムシのコンタミを防止した。また、増殖の長期安定を図るため、水槽内に玉石または接触酸化ろ過床用のろ材を投入し、生物ろ過による水質浄化を行った。

② 水 槽

コンクリート製25m³角型水槽を、最大時3面使用し、塩ビパイプ(径13～16mm)製エアブロックで通気した。

③ 餌 料

パン酵母とクロレラを併用した。

パン酵母は、ワムシ1億当り、80～90g/日を、定量ポンプを使用して17時より翌朝8時迄の間に給餌した。

生クロレラは、培養開始時に700～1,000万セル/mlとなるよう添加し、以降は、1～2日置きに、1～3m³分(2,000万セル/ml換算、以下同様)程度を添加した。

冷凍クロレラは、生クロレラの添加を行わない日に、3～5m³/日程度を給餌した。当初は、解凍後定量ポンプを使用して、2～3時間をかけて給餌していたが、未解凍のまま投入し、培養槽内で自然解凍させても特に支障がみられなかったことから、後には、全て未解凍のまま直接給餌した。

④ 培養方式と収穫

使用水槽の形状と数、収穫等管理の容易さなどから、培養はすべて間引き方式で行った。開始時のワムシ密度を10～30個体/mlとし、100～150個体/mlとなった時点で収穫を開始した。

⑤ 水 温

種苗生産対象魚種が冷水性で飼育水温が低いため、ワムシ培養水温もこれにあわせて、極力低水温を維持するよう努めた。60年度は、ワムシの増殖率が、必要量を供給するのに差し支えない

表2 冷凍クロレラおよび生クロレラで栄養強化したワムシの一般組成と脂肪酸組成

処理方法	未処理	生クロレラで 栄養強化	冷凍クロレラで 栄養強化
一般組成			
水分	88.3	88.9	88.4
蛋白質	7.0	6.5	6.7
糖質	1.6	1.4	1.3
灰分	2.1	2.1	2.6
脂質	1.0	1.1	1.0
脂肪酸			
14:0	2.8	3.2	3.6
16:0	9.4	11.0	13.1
16:1	21.4	20.9	20.7
18:0	3.2	2.5	2.1
18:1	25.9	20.2	17.1
18:2 ω 6	5.5	5.1	4.5
18:3 ω 3	0.2	0.3	0.5
18:4 ω 3			
20:1	4.4	3.7	3.5
20:2			
20:3 ω 3	2.7	3.5	4.0
20:4 ω 3	0.2	0.2	0.2
20:5 ω 3	12.4	16.5	19.0
20:5 ω 6			
22:1		2.4	2.1
22:3			
22:3 ω 3			
22:5 ω 3	3.1	3.5	3.7
22:5 ω 3	1.1	1.2	0.7
$\Sigma \omega$ 3 (20:3<)	16.8	23.8	23.6

程度に見込める14℃～15℃とした。

⑥ ゴミの除去

餌料のフロック等のゴミを除去するため、エアフィルターを充填したバケツを1槽当り1～3個設置し、エアリフトで培養水を循環した。また、1日に数回槽内を攪拌し、ゴミの沈澱による還元層の発生を防止した。

2) 60年度培養結果の概要

表3及び図2に60年度の培養結果の概要を示した。60年度は、12月20日から7月20日までの間培

表3 昭和60年度のワムシ培養結果の概要

培養 期間 (日数)	総生産量 (億個体)	日平均生産量 (億個体/日)	単位当り生産量 (億個体/m ³ /日)	餌 イースト(kg)	餌 生クロレラ(m ³)	料 冷凍クロレラ(m ³)	水 温 (℃)	ワムシの形状
冬期 12.20-3.20 (100)	394	3.9	0.10	370.6	220.4	236.2	13.8-17.5	L型100% (230-310um)
春期 3.22-7.20 (120)	612	5.1	0.12	439.2	527.5	59.5	17.0-25.0	同上

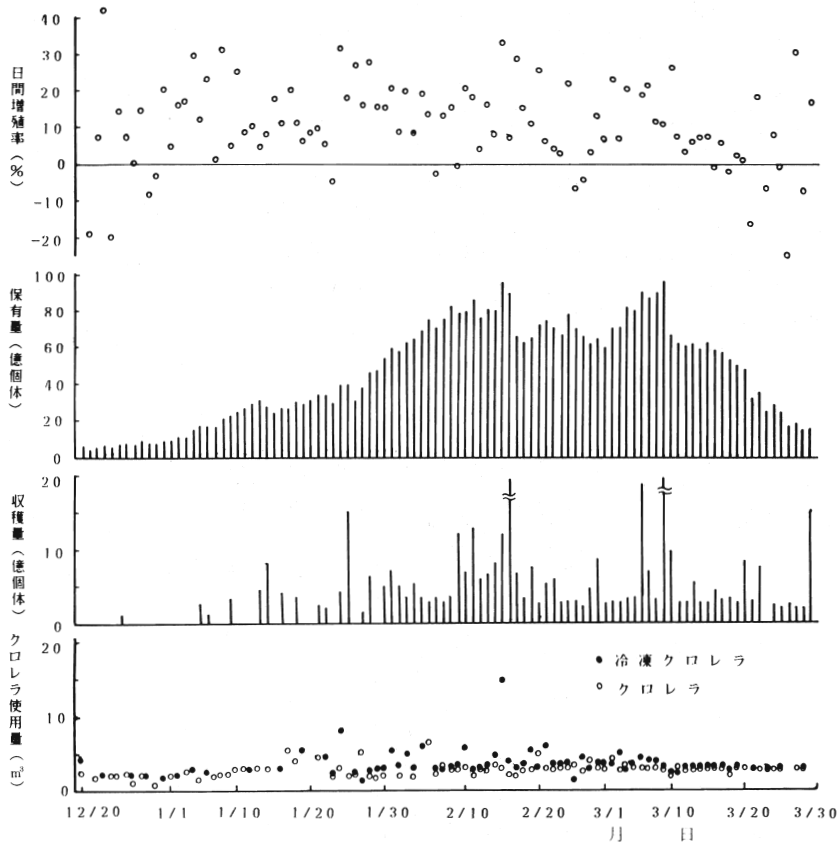


図2 昭和60年度冬期のワムシ培養経過

養を行った。冬期にはマダラ、マガレイ等を供給対象とし、水温14～15℃で、冷凍クロレラを使用して培養を行った。また、春期にはヒラメを対象とし、水温17～25℃（自然水温）で生クロレラを主体として培養を行った。

冬期の培養では、59年12月20日から60年3月29日までの100日間に、394億個体のワムシを生産し、単位当りの生産量は0.10億個体/m³/日であった。クロレラは総計458.6m³を使用し、このうち236.2m³、52%を冷凍クロレラでまかなった。

春期の生産は、3月22日に開始し7月20日までの120日間に612億個体のワムシを生産し、単位当り生産量0.12億個体/m³/日であった。クロレラの使用量は、生クロレラ527.5m³、冷凍クロレラ59.5m³であった。

冬期及び春期の培養事例を、表4-1～3に示した。事例1～3は、冬期に冷凍クロレラを使用して培養したもの、事例4、5は、春期に生クロレラを主として培養したものである。事例1～3では、日間増殖率12.9～15.2%、単位当り生産量0.12～0.17億個体/m³/日で、平均の間引き率は

表4-1 60年度ワムシ培養における事例別培養結果

事例 No.	培養期間 (日数)	水温 (℃)	総生産量 (億個体)	日平均生産量 (億個体/日)	単位生産量 (億個体/m ³ /日)
1	1.17-2.16 (30)	14.7	70.9	2.44	0.12
2	1.24-2.28 (35)	15.5	127.9	3.65	0.17
3	2.10-3.9 (27)	14.7	81.7	3.03	0.14
4	4.17-5.30 (43)	18.5	166.4	3.87	0.19
5	6.7-7.8 (31)	20.8	106.7	3.44	0.17

表4-2 同、各事例におけるワムシ密度、増殖率、卵率

事例 No.	元種 (含追加分) (億個体)	開始時密度 (個体/ml)	収穫時密度 (個体/ml)	日間増殖率 (%)	平均間引き率 (%)	平均卵率 (%)
1	15.1	36	158 (118-187)	12.9	10.0	44.7
2	8.0	35	170 (109-222)	15.2	14.0	48.4
3	16.3	26	155 (107-214)	13.8	12.1	45.6
4	4.5	9	177 (105-222)	19.3	16.5	47.3
5	9.0	14	178 (138-233)	15.8	15.9	38.5

表 4-3 同、各餌料の使用量および単位生産当りの使用量

事例 No.	イースト (kg)		生クロレラ (m ³)		冷凍クロレラ (m ³)		クロレラ (total) (m ³)		クロレラ比率* (%)
	A	B	A	B	A	B	A	B	
1	70.1	0.99	37.3	0.53	51.5	0.73	88.8	1.26	58
2	86.2	0.67	39.8	0.31	51.7	0.40	91.5	0.71	57
3	59.1	0.72	29.8	0.36	35.0	0.43	64.8	1.36	54
4	89.8	0.54	169.5	1.02	18.0	0.10	187.5	1.12	10
5	72.7	0.68	61.0	0.57	0	0	61.0	0.57	0

A：使用量

B：ワムシ 1 億個体生産に使用した量

※：冷凍クロレラ使用比率（冷凍クロレラ使用量／クロレラ (total) 使用量）

10～14%であった。ワムシ 1 億生産当りに使用したクロレラ量は0.71～1.36m³となり、このうち54～58%を冷凍クロレラでまかなった。

一方、事例 4、5 では、日間増殖率15.9～19.3%、単位当り生産量0.17～0.19億個体/m³/日で、平均の間引き率は15.9～16.5%であった。ワムシ 1 億生産当りに使用したクロレラ量は0.57～1.12m³となり、事例 4 では90%、事例 5 では、100%を生クロレラでまかなった。

各事例の単位当り生産量を比較すると、事例 4、5 が10～20%程度高い値となっている。しかし、事例 1～3 の培養水温は、事例 4、5 と較べて4～5℃程度低いことから、この生産量の差は使用した餌料の違いよりも水温差の影響の方が大きいと考えられる。したがって、培養に使用するクロレラの50%程度を、冷凍クロレラで代替してもワムシの生産に支障をきたすことはないと推察される。

図 3、4 に、事例 2、4 の培養経過を示した。冷凍クロレラを主に使用した事例 2 では、1～3 日置きに生クロレラを使用し、他は、全て冷凍クロレラを使用した。一方、事例 4 では、ほとんど生クロレラを使用したが、一時クロレラ培養が不調となったため、補助的に冷凍クロレラを使用した。両事例とも増殖の傾向は類似しており、25日目頃までは、安定的に収穫できたが、それ以降増殖が不安定となった。事例 2 については、水槽のローテーションの関係で35日目で培養を終了した。

図 5 に、0.5m³元種水槽で、冷凍クロレラとパン酵母だけで培養した事例の培養経過を示した。この事例では、餌料の主体をパン酵母とし、収穫時又は、増殖率の低下時に0.5～1 m³の冷凍クロレラを給餌した。

パン酵母単独でワムシを培養すると、短期間で増殖が不調になる場合や、植え替え後の増殖率が低下する場合が多い。しかし、本事例では、収穫したワムシの全てを次の培養の元種として使用したにもかかわらず、増殖の不調はみられなかった。

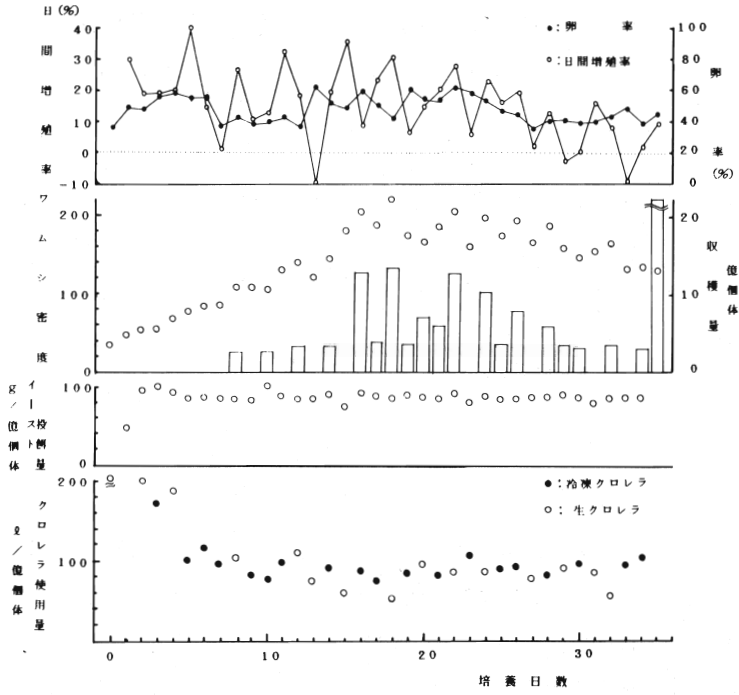


図3 事例2 (冷凍クロレラ使用) の培養経過

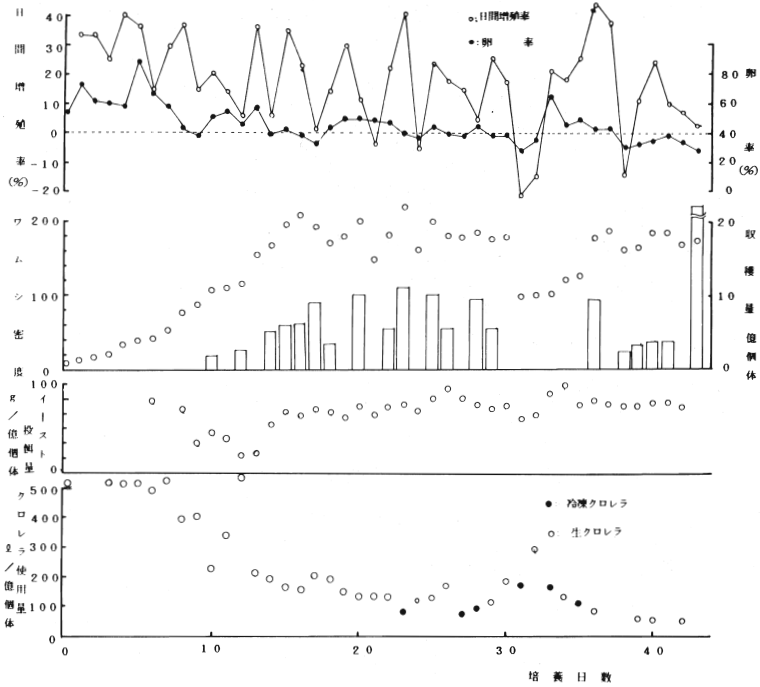


図4 事例4 (生クロレラ主体) の培養経過

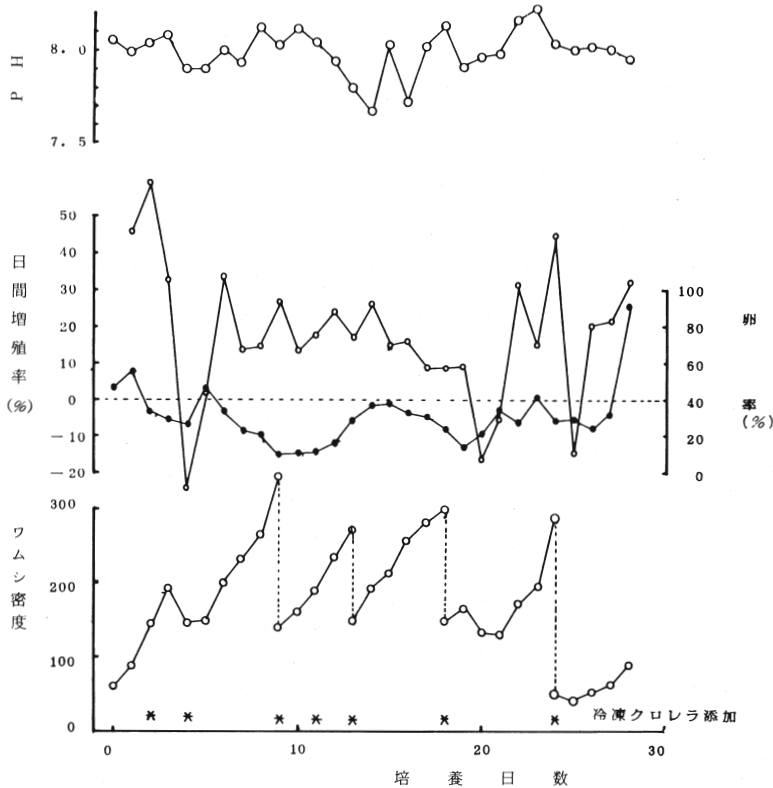


図5 冷凍クロレラおよびパン酵母だけの培養事例

5. 論 議

北島（1983）が行った各種苗生産機関へのアンケート調査によれば、海水魚の種苗生産を行う全ての機関で海産クロレラを使用しており、その50%以上がワムシ培養水槽の2倍以上のクロレラ培養水槽を使用している。また、多くの機関から挙げられているワムシ培養の問題点として、良質のクロレラの不足がある。

クロレラをワムシ培養に利用する上での問題点としては、

- 1 クロレラを培養するためには広い水槽を必要とする。
- 2 水温、日照等の自然条件により、増殖が左右されるため、周年安定的に供給することが出来ない。
- 3 培養海水ごと扱わなければならないため移動が大変である。特に、大量の輸送は困難である。

等が挙げられる。ワムシ培養において、クロレラを使用してワムシをより大量に安定的に培養するためには、これらの問題点を解決することが必要である。

冷凍クロレラの利用は、クロレラを保存して使用するという点を可能とした点で、問題点の解決策として有効な方法のひとつであると考えられる。

クロレラを濃縮して冷凍保存することにより、一時期に大量のクロレラを使用することも可能であり、

また、取り扱いも非常に簡単なものとなっている。今回の結果では、クロレラ使用量の約50%を冷凍クロレラで代替することが可能であったが、この50%という比率については、あくまでも当面の目標とした数字であり、今後は、より高くしてゆくことも可能と考えられる。特に、最後に述べた事例では、100%冷凍クロレラを使用することも可能であった点からみて、かなり高い比率で冷凍クロレラを使用することも可能と考えられる。

しかし、一方、冷凍クロレラは、餌料としてクロレラを有効に利用するためのものであり、生きたクロレラが持っている光合成による自浄能力は全く持っていない。したがって、ワムシの培養環境を考えた場合、100%冷凍クロレラを使用するのではなく、環境を維持できる程度については、生クロレラを使用することが望ましいと考えられる。これが何%に相当するのかは、現時点では全く不明であり、今後冷凍クロレラを使用する上での大きな課題のひとつとなると考えられる。

6. 要 約

- 1 種苗生産規模の増大と、生産対象魚種の多様化によるクロレラの不足を補うため、クロレラを濃縮冷凍保存し、ワムシの餌料として使用する事を試みた。
- 2 冷凍保存した濃縮クロレラは、冷凍後8ヶ月を経過しても ω 3HUF Aの減少はみられなかった。
- 3 冷凍クロレラを使用して二次強化を行ったワムシの ω 3HUF A含有率は、生クロレラを使用した場合と変わらなかった。
- 4 昭和60年度のワムシ培養で冷凍クロレラを使用し、クロレラ使用量の約50%を冷凍クロレラでまかになった。
- 5 冷凍クロレラを使用した培養事例と、生クロレラを主体とした培養事例には大きな差はみられず、冷凍クロレラを使用した培養も十分可能であった。
- 6 以上の結果から、冷凍クロレラをげ生クロレラの代替としてワムシ培養に使用することが可能であることが判明した。代替の比率については、さらに向上する可能性もあり、今後、十分検討する必要がある。

参 考 文 献

- 藤田 矢郎 (1975) 稚魚の大量飼育, 稚魚の摂餌と発育 (日本水産学会編) pp. 100~113
- 東原考規・福岡誠一・阿部敏男・水原一瓢・今田克・平野礼次郎 (1983) 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ワムシ, *Brachionus plicatilis*の培養, 日水誌49 (7):1001~1013
- 平田八郎・森保樹 (1967) 食用イーストの給餌によるしおみずつばわむしの培養, 栽培漁業5 (1-2):36~40
- 伊藤 隆 (1960) 輪虫の海水培養と保存, 三重大紀要3 (3):708~740
- 今田克・影山百合明・渡辺武・北島力・藤田矢郎・米康夫 (1979) 魚介類種苗生産用酵母 (油脂酵母)

の開発, 日水誌45 (8): 955~995

北島力・藤田矢郎・大和史人・米康夫・渡辺武 (1979) クロレラで二次培養したパン酵母ワムシの餌料効果, 日水誌45 (4): 469~471

北島力・荒川敏久・大和史人・藤田矢郎・今田克・渡辺武・米康夫 (1980) マダイ仔魚に対する油脂酵母ワムシの餌料効果, 日水誌46 (1): 43~46

北島力 (1983) 大量培養, シオミズツボワムシ, 恒星社厚生閣pp. 102~128

日本栽培漁業協会 (1983) 昭和57年度日本栽培漁業協会事業年報pp. 124~126

日本栽培漁業協会 (1984) 昭和58年度日本栽培漁業協会事業年報pp. 88~92

岡内正典・福所邦彦 (1982) テトラセルミス *Tetraseilmis tetrathele* によるシオミズツボワムシの培養, 昭和57年度日本水産学会秋季大会講演要旨集p. 65

多賀信夫・安田公昭 (1979) 餌料微生物フロックの生産とその利用に関する基礎的研究, 瀬戸内海栽培漁業協会 資料No. 13, 45pp

渡辺武・荒川敏久・北島力・福所邦彦・福田矢郎 (1978) 脂肪酸組成からみたシオミズツボワムシの栄養価, 日水誌44 (10): 1109~1114

[質疑応答]

桑原 (山口外裁セ) 冷凍濃縮保存クロレラのみを使うとワムシの増殖率が下がっているが、時々生きたクロレラを入れないとだめなのか。

早乙女 ワムシの状態が悪くなったとは考えられない。餌より他の水槽内の環境によると思う。

金田一 (青森増セ) 1) 能登島事業場からもらった冷凍クロレラをビン培養してみたら再生した。緩慢冷凍クロレラでも再生するか。 2) クロレラにラン藻が混じっていた場合、濃縮の段階で除くことができるか。

早乙女 1) 以前のクロレラは液体窒素を使ったもので冷凍緩慢の場合わからない。再生用のクロレラは低温保存したものを使用している。 2) ラン藻は数か月の保存に耐えられないし、最後の濃縮の段階で細胞が破壊される。

本尾 (京都海セ) 1) 濃縮保存クロレラは二枚貝の餌として使用できるか。 2) 乾燥粉末クロレラの製造使用の可能性はあるか。

早乙女 1) 死んだクロレラであるので飼育槽の底に沈みやすく、飼育水の汚れが予想されるので使用は難しい。ただし、細胞を生かしたままで保存する方法ができれば使えるだろう。 2) 現在やっていない。上浦事業場で試みているが、まだ結果を聞いていない。将来着手したい。