

原著論文

循環式培養システムを用いたシオミズツボワムシの連続培養

森田哲男^{*1}・小磯雅彦^{*2}・今井 正^{*1}・手塚信弘^{*3}・山本義久^{*1}Continuous Culture of the Rotifer *Brachionus plicatilis* sp. complex Using a Recirculating System

Tetsuo MORITA, Masahiko KOISO, Tadashi IMAI, Nobuhiro TEZUKA and Yoshihisa YAMAMOTO

We developed a continuous culture system of the rotifer *Brachionus plicatilis* sp. complex using a recirculating system for reuse of the effluent water after harvest of the rotifers. In the recirculating system, the effluent water was treated with a protein skimmer and biofilter, and added continuously to the culture tank at a flow rate of 650 L/day. Rotifer cultures were continued to 25 days in media with 25°C and salinity 26, in comparison with a flow through system where new diluted seawater was added continuously. Total harvests of rotifer in the recirculating and flow through systems were 39.1-40.2 billion and 38.0-39.7 billion, respectively. In the recirculating system, nitrate concentration gradually increased, while the poisonous unionized ammonia concentration remained low in both systems. By use of a recirculating system, the volume of waste water per day was decreased by approximately 97%. The initial cost of a recirculating system was 1.69 times higher than the flow through system, while the running cost was 0.56 times lower. Supposing that more than five rounds of 25days' culture are carried out, the initial investment can be collected, and the cost of rotifer production will go down less than the flow-through system.

2013年2月8日受付, 2013年5月22日受理

シオミズツボワムシ *Brachionus plicatilis* sp. complex (以下, ワムシ) は, 海産魚類や甲殻類の種苗生産の初期餌料として大量安定供給が不可欠である¹⁾。1990年代に培養用餌料として品質の安定した市販の濃縮淡水クロレラ²⁾が導入され, それを用いた科学的理論に基づく魚介類の流水式飼育に近い連続培養法^{3,4)}, 宅配による高密度輸送法⁵⁾が開発され普及したことで, 近年, 培養と供給の安定性と効率性が大幅に改善された。しかし, 培養コストの削減, ワムシ培養水槽の細菌叢に起因する増殖阻害細菌等による培養不調^{6,7)}や大量の有機物を含んだ培養廃水の処理及びその対策, さらに仔稚魚の種苗生産過程でのワムシ由来と思われる細菌性疾病等の発

症⁸⁻¹¹⁾等, 今後取り組むべき課題も山積している。既存の連続培養法では, 新たな海水を常時培養系に導入し, 使用済みの培養水を排出している。この廃水を循環再利用できれば, 培養系への導入水量が大幅に低減できるため, 用水とともに持ち込まれる有害物質や病原性生物の管理が可能となる。また, 廃水量も極めて少なくなることから, 培養に伴って発生する環境負荷物質を集約的に処理できると考えられる。国外では連続培養法ではないが, 培養水槽の個体数を一定量維持し増殖分だけを毎日間引き収穫する, いわゆるバッチ式と呼ばれている培養廃水を再利用した循環式のワムシ培養法が考案されている¹²⁾。しかし, このシステムは, オゾン発生装置や紫

*1 独立行政法人水産総合研究センター瀬戸内海区水産研究所

*2 独立行政法人水産総合研究センター西海区水産研究所

*3 独立行政法人水産総合研究センター日本海区水産研究所

〒761-0111 香川県高松市屋島東町234

National Research Institute of Fisheries and Environment of Inland Sea, FRA, 234 Yashimahigashimachi, Takamatsu, Kagawa 761-0111, Japan

tetu@affrc.go.jp

外線殺菌装置ならびに複数の泡沫分離器が組み込まれており、イニシャルコストが高く、システム自体が複雑であること等から日本国内では普及していない。一方、国内の海産魚の種苗生産においては、近年研究が進み、より簡易かつ安価なシステムが開発されてきたことにより¹³⁻¹⁶⁾、多くの種苗生産対象種で実証実験が取り組まれている^{17-20)*4,*5)}。このような背景から既存の臨海地域だけでなく、内陸での陸上養殖が可能となり、これらの餌料として用いるワムシについても簡便で安価な循環式の培養での技術開発に期待が大きい。

そこで本研究では、既存のワムシ連続培養システム²¹⁾(以下、流水式連続培養システムと定義)を循環式にした新しい培養システム(以下、循環式連続培養システムと定義)を製作して、従来の流水式連続培養システムとの比較により、ワムシ培養の可能性を検証した。また、試作したシステムの設計が適正であるかの判断材料として、培養実験の中で本システムの水質浄化能力や硝化能力を調査した。なお、本システムは、地先の海水が入手し難い陸上養殖分野での利活用が期待されるため、両システムとも人工海水を使用した実験を行った。

材料と方法

循環式連続培養システムの構成 循環式連続培養システムは、培養水槽、収穫水槽、回収水槽、泡沫分離装置、生物ろ過装置および給餌装置、調温装置で構成し、システムの総水量は2,900L、うち培養水槽の水量は1,000Lとした(図1)。培養水槽と収穫水槽には1,000Lのアルテミアふ化槽、回収水槽には1,500Lの組み立て式水槽(くみたてそう：(株)ナショナルマリンプラスチック)を用いた。泡沫分離装置は市販の泡沫分離器(ボルケーノVL-3D：オーシャンアース(株))と循環ポンプ(0.16kw：三相電気(株))、生物ろ過装置は500Lの角形プラスチック水槽(サンボックス#500、三甲(株))を上下2段に設置し、水槽内にろ材を充填し、循環ポンプ(同)で循環させた。ろ材は、上段には親水性セラミックス(フィルテックスFB-4：フィルテック(株))250L(約84kg)、下段にはサンゴ砂(直径1.0mm 活性サンゴ)400L(約380kg)を敷き詰め、ろ過方式は下流式の浸漬法とした。ろ材の熟成²²⁾は、硝化細菌が十分に付着した少量のろ材を元種として塩化アンモニウム粉末を10~20mg/Lになるよう添加して、水温25~30℃、塩分25~30により実験開始前に約1ヶ月間行った。ワムシの餌となる濃縮淡水クロレラ(生クロレラV12：クロレラ工業(株)、以下、クロレラ)を添加するための給餌装置は、給餌タンク(薬液タンクMT-50N：(株)イワキ)と定量ポンプ

(EHN-CVCR-NAE：(株)イワキ)からなり、24時間連続的に培養水槽へ給餌できるようにした。これらの装置以外に多孔質セラミックストーン(通気量約5L/分)を培養水槽に4つ、収穫水槽、回収水槽、生物ろ過槽の上段、下段に1つずつ、懸濁物除去用マット(サランロックOM-150, 105×50×2.5mm：サランロック(株))を培養水槽に2枚設置した。懸濁物除去用マットはワムシ計数後に1日1回取り出し水道水で洗浄した。調温装置はボイラーで暖められた35~40℃の温水が流れるチタン製パイプ配管を培養水槽、収穫水槽、生物ろ過槽上段に設置した。なお、循環水の一部は、泡沫分離処理(以下、泡沫廃水)、懸濁物除去用マットの取出し(以下、作業廃水)、ワムシ収穫(以下、収穫廃水)、蒸発等(以下、その他廃水)によりシステム系外に排出された。

循環式連続培養システムでの循環水の流れ 循環式連続培養システムは、後述するワムシの餌となるクロレラの給餌以外では新たな水の補充は行わない方法とした。システムの概要は、後述するバルブ類やポンプ類の番号を含めて図1に示した。循環式連続培養システム内での循環水の流れは、常時、生物ろ過槽で処理した水を培養水槽へ650L/日の割合で注水することから始まり、培養水槽における培養水の増加分は、排水口を塩ビ製パイプで繋いだ収穫水槽へ貯水した。両水槽の水位調整は、培養水槽に立ち上げた塩ビ製パイプを用いたオーバーフロー方式で行った。収穫水槽に貯水されたワムシを含む循環水は、毎日同時刻に1回行う収穫時のみバルブ(V3)を開放し、回収水槽内でプランクトンネット(目合63μm)によりろ過して濃縮されたワムシのみを収穫した。ろ過した循環水は、循環ポンプ(P2)で回収水槽から泡沫分離装置へ循環させ泡沫分離処理により懸濁物を除去した後、生物ろ過装置へ移送した。これにより水量の増した生物ろ過装置内の循環水はオーバーフローさせて回収水槽へ排水し繰り返し泡沫分離処理を行った(1日あたり延べ105kL)。生物ろ過装置では上段と下段の水槽で循環水を循環ポンプにより循環させ硝化細菌群による硝化処理を行った。循環ポンプ(P3)により汲み上げられた循環水は上段の水槽へ送られ、水量の増した上段の水槽の循環水はオーバーフローさせて下段の水槽へ循環させ繰り返し硝化処理を行った(1日あたり延べ104kL)。上段の水槽への循環量はバルブ(V4)で調節し、注水口は効率よく酸素供給するためにシャワー状に散水できる形状にした。また、生物ろ過装置内の循環水の一部を調整はバルブ(V5)で調節しながら、培養水槽への注水に用いた。

*4 森田・今井・山本, 平成23年度日本水産学会春季大会講演要旨集, 2011

*5 御堂岡・相田・飯田・今井・森田・山本, 平成23年度日本水産学会春季大会講演要旨集, 2011

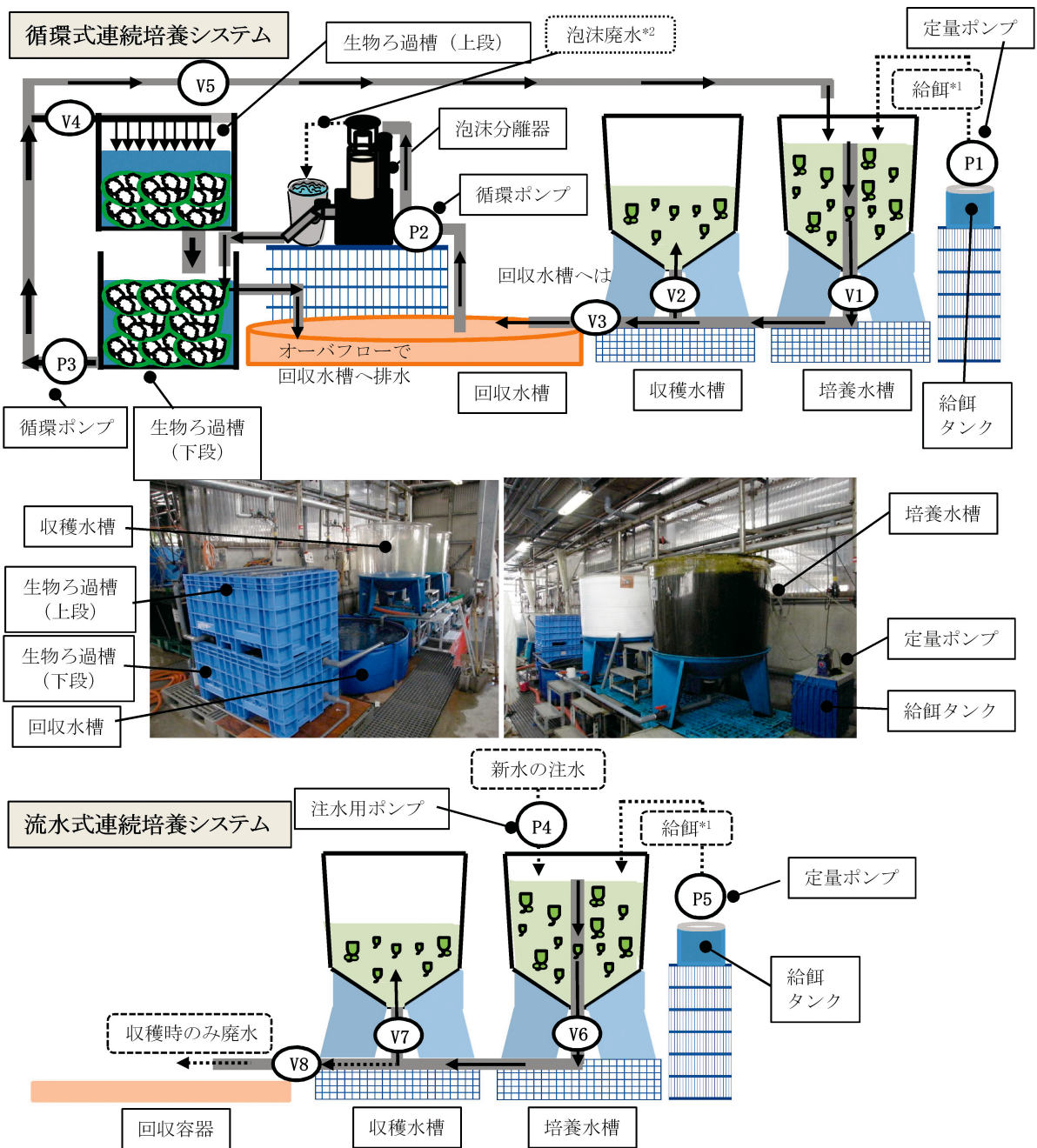


図1. 循環式連続培養システムと流水式連続培養システムの模式図および、循環式連続培養システム設置写真

Pはポンプ類、Vはバルブ類を示し、各ポンプ類、バルブ類には便宜上通し番号を入れ、P1、V1などで表現した四角の実線で囲んだものは機器等の名称、丸の点線で囲んだものは水の添加または廃水の説明を示している。実線の矢印はシステム内の水の循環を示し、点線の矢印は水の添加または廃水を示している。

模式図には示していないが、循環式連続培養システムではエアーストーンを培養水槽・収穫水槽・回収水槽・生物ろ過槽、懸濁物除去マットを培養水槽、調温装置（チタン製パイプ配管）を培養水槽・収穫水槽・生物ろ過槽上段に備えている。

*1 培養1日目はクロレラ 3L、培養2～24日目はクロレラ 5L を水道水 25L で希釈して毎日給餌した。

*2 泡沫分離器からの泡沫廃水

試験設定 実験は、(独)水産総合研究センター瀬戸内海区水産研究所屋島庁舎(以下、屋島庁舎)で2011年1月18日及び2012年2月1日に培養期間を25日間とした培養実験を各1例ずつ実施した。循環式連続培養システムを用いた培養実験区(循環1,2区)の対照区として、同型の培養水槽と収穫水槽を用いて同一の培養条件で一般的な流水式連続培養システムを用いた培養実験(流水1,2区)を行った(図1)。培養経過日数はワムシ接種日を0日目とした。

供試ワムシ ワムシは(独)水産総合研究センター日本海区水産研究所能登島庁舎で培養されたS型ワムシ八重山株(携卵個体の平均背甲長:185±9µm)を用いた。実験に必要なワムシ数を確保するために、屋島庁舎において1,000~5,000L水槽を用いて、水温25℃、塩分25~30の条件で、餌料にはクロレラを給餌して植え継ぎ式による拡大培養を行った。拡大培養の海水にはろ過海水を用いた。

培養方法と水質調査 培養水には、人工海水粉末(テトラマリンソルトプロ, テトラジャパン(株))を塩分25~26に調整したものを用いた。水温は収穫水槽以外では25℃、収穫水槽は20℃に調温した。培養水槽に1,500個体/mLの密度でワムシを接種し、2,000個体/mL以上に増えた段階で、循環1,2区では循環水の循環を、流水1,2区では新たな人工海水の注水を開始した。培養水槽への循環または注水量はこの培養条件でのS型ワムシの増殖率を考慮して650L/日を基準とした²¹⁾。餌料は、ワムシ接種日にはクロレラ3L、1日目以降にはクロレラ5Lを水道水25Lで希釈して給餌装置を用いて連続給餌した。ワムシ密度の計数は毎日、培養水槽と収穫水槽で行った。また、培養水槽では総卵数を計測し、個体数に対する卵の割合(卵率)を求めた。ワムシ数及び卵数の計数は、攪拌した試料より定量ピペットで0.2mLの採水を2回行って平均値で算出して求めた。計数値に20%以上差がある場合は、採水からやり直して計数した。

水質調査は毎日行い、培養水槽の水温と塩分を塩分計(Model 30, YSI/Nanotech(株)), pHをpHメーター(SG2: Mettler Toledo), 溶存酸素量(DO)をDOメーター(Model55: YSI/Nanotech(株))でそれぞれ測定した。また、各培養水槽から毎日採水し、フィルター(プレフィルター AP2504700, MILLIPORE)でろ過した後、三態窒素濃度を測定した。アンモニア態窒素濃度はサリチル酸法、亜硝酸態窒素濃度はジアゾ化法、硝酸態窒素濃度はカドミウム還元法を用い、いずれも吸光度計(DR5000, HACH)で測定した。また、アンモニア態窒素濃度、pH、塩分、水温から毒性の極めて強い非解離アンモニアの濃度をBOWER and BIDWELL²³⁾の次式により求めた。

$$\text{NH}_3 = (\text{NH}_4 + \text{NH}_3) \times \{1 + \log(\text{pKas}(\text{T}) - \text{pH})\} - 1$$

$$\text{pKas}(\text{T}) = \text{pKas} + 0.0324 \{298 - (t + 273)\}$$

ここで、 t は摂氏水温、 pKas は定数を示し、塩分、水温から $\text{pKas}=9.32$ である。

各実験区での用水の収支を把握するため、添加量についてはクロレラの量とクロレラの希釈に用いた水道水量、流水区では人工海水の添加水量を、廃水量については泡沫廃水、作業廃水、収穫廃水、その他廃水の量をそれぞれ調べた。

循環式連続培養システムの水質浄化能力 システムにおける懸濁物除去能力と硝化能力を調べるため、懸濁物の負荷やアンモニア態窒素の増加が生じるワムシ収穫後より各種測定を行った。測定は循環1区の培養6,13,20日目に実施した。懸濁物除去能力の指標としてワムシ収穫12時間後まで2時間ごとの濁度と泡沫廃水量を測定した。濁度は回収水槽から採水し吸光度計(DR5000, HACH)を用いて波長460nmでの吸光度を求め、次式により算出した。

$$\text{濁度 (JIS}^\circ) = 532.39 \times (\text{吸光度}) - 4.6526$$

泡沫廃水量は廃水量をメスシリンダーにより10mL単位まで測定した。

硝化能力は、ワムシ収穫8時間後まで1時間ごとに回収水槽から採水して三態窒素を測定し、水質浄化部分の硝化能力の指標としてアンモニア濃度が1mg/L以下になるまでの低下速度を求め、経過時間とアンモニア態窒素濃度の回帰直線を最小二乗法により求め、アンモニア態窒素の硝化速度は次式により算出した。

$$\text{アンモニア態窒素の硝化速度 (g-N/h)} = \text{回帰直線の傾き} \times \text{処理水量 (kL)}$$

ここで処理水量は、システムの総水量から、アンモニア態窒素濃度1mg/L以上検出される時間までの培養水槽と収穫水槽の貯水量を除いた平均水量を示す。

なお、収穫直後は収穫時の廃水が十分に混合されないため、濁度やアンモニア態窒素濃度の測定値が安定する収穫後20分を経過した時刻を収穫0時間後と定義し、その後は0時間後を起点として1または2時間間隔で測定した。泡沫廃水は、収穫直後から定義上の収穫0時間後までの20分間についても廃水されるため、収穫0時間後までの廃水量も測定した。

イニシャルコストとランニングコストの比較 循環1区と流水1区の培養結果から両実験区のイニシャルコストとランニングコストを試算した。イニシャルコストは、培養水槽、収穫水槽、回収水槽、泡沫分離装置、生物ろ過装置、給餌装置、注水関連資材、消耗品類に区分して算出した。ランニングコストは、クロレラ代、水道代、人工海水粉末代、電気代に区分し、調温に用いた加温経費は培養を行う時の外気温により大きく変化するため含めなかった。なお、試算には含めなかったが、両実験区

における作業時間をろ材の設置，ろ材の熟成，人工海水作製，培養，水槽洗浄の5項目に分類して1分単位で計測した。ろ材の設置作業時間は，ろ材をシステムへ設置するのに要した時間，ろ材熟成作業時間は，ろ材の袋詰め，熟成に用いる塩化アンモニウムの添加，換水等のろ材の熟成に要した時間，人工海水作製時間は，人工海水粉末を溶解させ，塩分の調整を行うのに要した時間，培養作業時間は，環境測定，ワムシ個体数の測定，懸濁物除去用マットの洗浄，ワムシ収穫作業等の培養全般に関わる時間，水槽洗浄時間は，実験終了後にシステムの洗浄作業に要した時間とした。

統計処理 収穫数については Student *t*-test または，Welch *t*-test を用いて，事前に同一培養条件の2回の培養に有意な差がないことを確認し，1区と2区の平均値を実験区の値として検定に用いた。検定の有意水準は $p=0.05$ とした。

結 果

培養中の水質変動 培養期間中の培養水槽の平均水温は循環区が 25.4℃ と 25.5℃，流水区が 25.1℃ と 25.4℃ で，平均塩分（範囲）は循環区が 25.2（24.0～26.4）と 26.1（25.4～26.9），流水区が 25.3（25.1～25.8）と 25.6

（25.3～25.8）であり，両実験区に大幅な違いはなかったが，循環区の方が変動は大きかった。溶存酸素量は流水区が 5.0～6.3mg/L の範囲で安定していたのに対して，循環区は 3.8～6.8mg/L の範囲で多少変動がみられた。pH は両実験区共に0日目は 8.1～8.2であったが，2日目に急落し，その後は 7.5～7.8 の範囲で安定した。実験期間中の平均 pH は流水区が 7.7～7.8，循環区が 7.6 であり，循環区では後述する硝酸態窒素の蓄積により若干低下するものの，ワムシの増殖や硝化能力に差が生じるような大きな差はなかった。また，図2に三態窒素および非解離アンモニアの経時変化を示した。アンモニア態窒素濃度は全実験区共に培養経過に伴い徐々に増加し，実験終了時の24日目には循環区が 70.5mg/L（循環1区）と 53.0mg/L（循環2区），流水区が 64.0mg/L（流水1区）と 98.0mg/L（流水2区）となったが，実験区による顕著な差はなかった。亜硝酸態窒素濃度は流水区では 0.1mg/L 以下で推移したのに対して，循環区では 0.6～1.2mg/L まで上昇した。硝酸態窒素濃度は流水区では培養期間を通じて 3mg/L 以下であったが，循環区では培養経過に伴って高くなり培養24日目には 148mg/L（循環1区）と 138mg/L（循環2区）に達した。非解離アンモニアは全実験区共に培養7～8日目までに約 1mg/L まで上昇し，その後，流水2区はさらに高くなり培養24日目には 3.0mg/L に達したが，他の3実験区で

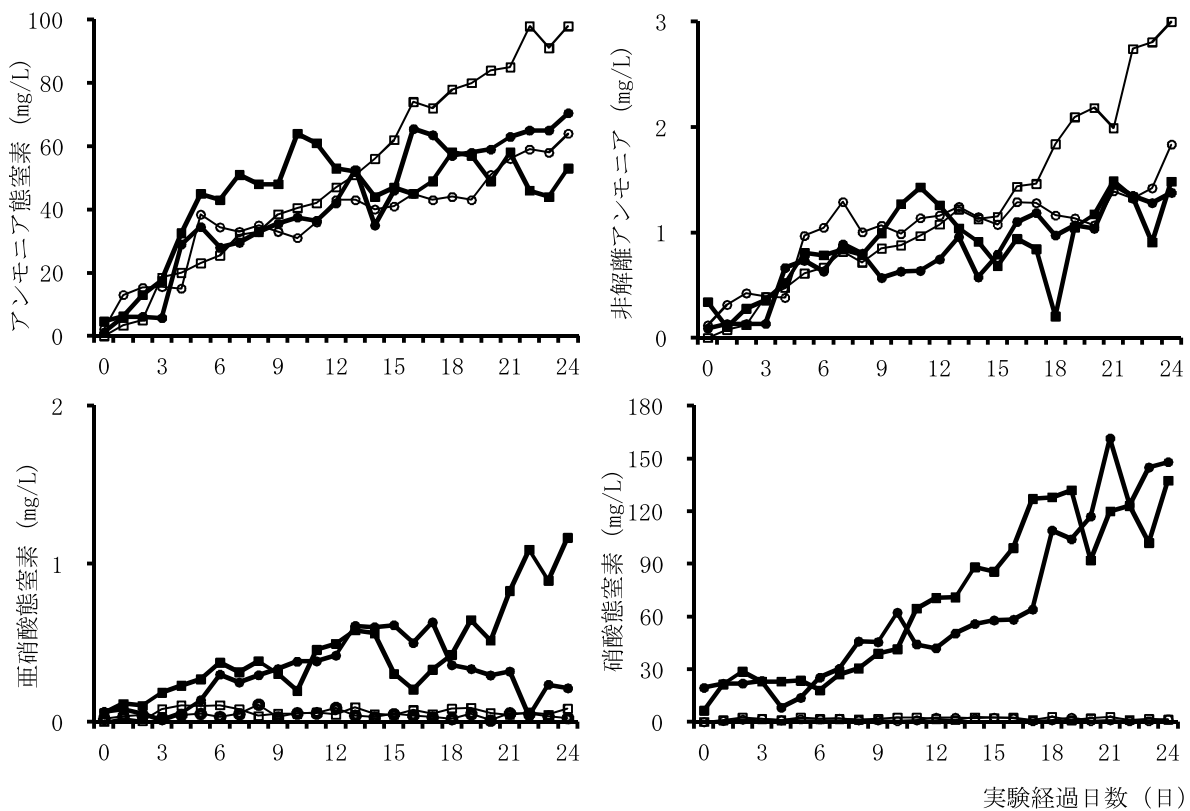


図2. 培養水槽における三態窒素濃度および非解離アンモニア濃度の経時変化
● 循環1区 ■ 循環2区 ○ 流水1区 □ 流水2区

は 1.5 ~ 2.0mg/L の範囲内に留まった。

ワムシ培養結果 図3には培養水槽のワムシ数と卵率、収穫数の経時変化を示した。培養水槽のワムシの個体数は全ての実験区において培養1日目に、接種した時の1.4 ~ 1.5倍にあたる20.2 ~ 23.7億個体まで増加し、その後、増減があるもののほぼ同様の水準で推移した。このことにより両実験区とも培養時の塩分、水温、給餌量から算出された既知²¹⁾の増殖率が維持でき、培養は順調に推移したと推測できた。実験期間における平均ワムシ密度(個体数と標準偏差)は循環区が2,253個体/mLと2,542個体/mL(22.5 ± 3.8億個体と25.6 ± 3.0億個体)、流水区が2,193個体/mLと2,346個体/mL(21.9 ± 3.0億個体と23.5 ± 2.4億個体)であり、平均値に顕著な差は認められなかった。卵率は11.8 ~ 79.2%であり実験区に関係なく毎日激しく変動したが、平均卵率と標準偏差は循環区が58.8 ± 15.1%と58.8 ± 13.5%、流水区が56.7 ± 12.0%と59.9 ± 10.2%であり、循環区の方が変動はやや大きい、平均値はほぼ同等であった。実験期間の総収穫数(1日あたりの収穫数と標準偏差)は循環区が390.8億個体と402.1億個体(17.0 ± 3.2億個体/日と17.5 ± 1.7億個体/日)、流水区が396.5億個体と379.7億個体(17.2 ± 1.6億個体/日と16.5 ± 1.2億個体/日)であり、1日あたりの収穫数は何れの実験区においても変動は小さく、総収穫数も差はなかった($p < 0.05$)。また、両実験区共に急激なワムシ密度の低下や収穫量の減少は認められなかった。

培養期間中の水の添加水量と廃水量 各実験区での水の添加水量と廃水量を表1に示した。添加水量は、全実験区共にクロレラ123Lとクロレラ希釈に用いた水道水600Lの計723Lがあり、それに加えて流水1区では14,991L、流水2区では14,819Lの新たな人工海水の添加があった。また、廃水量は循環1、2区共に773Lに対して、流水1区では15,714L、流水2区では15,542Lであった。なお、循環1、2区では実験終了時まで

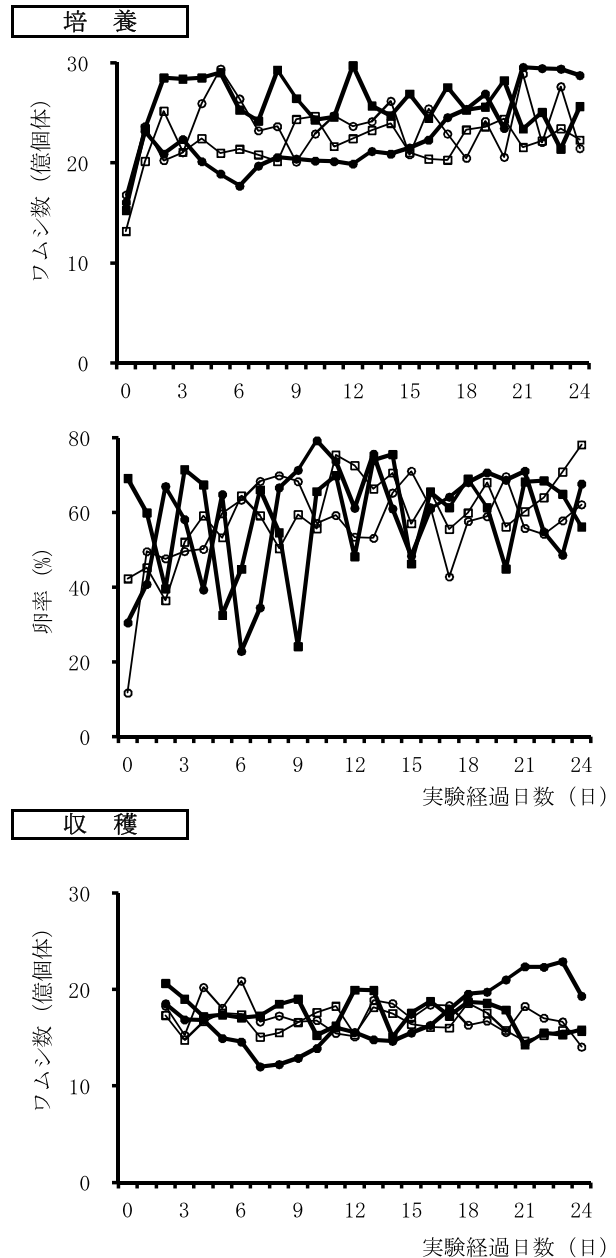


図3. 培養水槽のワムシ数と卵率、収穫ワムシ数の経時変化 ● 循環1区 ■ 循環2区 ○ 流水1区 □ 流水2区

表1. 実験における水の添加水量と廃水量

実験区	添加水量の内訳(L)			廃水量の内訳(L)				実験中 ^{*2} の減水量(L)		
	給餌による添加		新水の添加 人工海水	廃棄物として廃水		収穫廃水	その他 ^{*1} 廃水		合計	
	うち、 クロレラ	うち、 水道水		泡沫廃水	作業廃水					
			合計	a	b	c	d	e	f	
循環1区	123	600		723	109	151	335	178	773	50
循環2区	123	600		723	94	156	379	145	773	50
流水1区	123	600	14,991	15,714		94	15,620		15,714	
流水2区	123	600	14,819	15,542		112	15,430		15,542	

*1 b ~ d で算出できなかった蒸発、飛沫等による廃水量で、実験終了後のシステムの減水量等から以下の計算式で算出、その他廃水量 (e) = a - (b + c + d - f)

*2 実験開始時 (2,900L) と終了時のシステム全体の水量の差とした

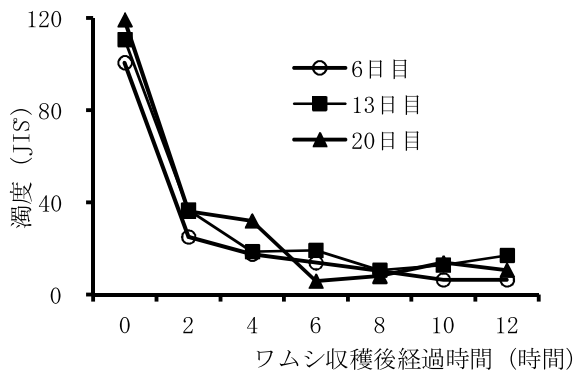


図 4. 循環 1 区におけるワムシ収穫後の回収水槽における濁度の推移

50L の減水があったが、減水による注水量の変動やポンプの作動不良などは生じなかった。

懸濁物除去能力 循環 1 区におけるワムシ収穫後の濁度の推移を図 4 に示した。濁度は 0 時間後には 110.8 ~ 119.4 であったが、その後経過時間に伴って急激に低下して 2 時間後には 25.2 ~ 36.9, 8 時間以降には 6.5 ~ 19.3 まで低下した。泡沫廃水総量は 4,640 ~ 4,930mL であった。経過時間に伴う時間ごとの泡沫廃水量と泡沫廃水総量に対する割合の内訳は、収穫 0 時間と 2 時間後の合計が 3,730 ~ 3,970mL, 77.9 ~ 84.5% でその後大幅に減少し、4 時間後が 530 ~ 940mL, 11.2 ~ 19.1%, 8 時間後が 0 ~ 40mL, 0 ~ 0.9% で、10 時間後以降の廃水はなかった (図 5)。濁度、泡沫廃水量の推移は 6, 13, 20 日目とも同様の傾向であった。

硝化能力 ワムシ収穫後のアンモニア態窒素濃度の推移を図 6 に示した。実験 6, 13, 20 日目の生物ろ過装置内の水温は 24.1, 23.9, 24.1℃ であった。アンモニア態窒素濃度は、ワムシ収穫直後である 0 時間後では 16.5, 21.5, 23.0mg/L であったものの、何れの実験日も 5 時間後までの濃度低下は直線的で、低下速度もほぼ同様であった。亜硝酸態窒素濃度は各培養日数共に 1 時間後から増加するが概ね 2mg/L 以下で推移し、9 時間後には 0.1 ~ 0.4mg/L まで減少した (図 7)。硝酸態窒素濃度は 0 時間後には 19, 39, 45mg/L で、その後直線的に増加し、7 ~ 9 時間後には 23, 58, 58mg/L に達したものの、以降顕著な増減はなかった。本システムでのアンモニア態窒素の硝化速度は 5.69 ~ 6.68g-N/h であり、それに基づく硝化完了までの時間は 5.47 ~ 6.72 時間と推定された (表 2)。

イニシャルコストとランニングコストの比較 イニシャルコストとランニングコスト試算結果を表 3 に示した。イニシャルコストは循環式連続培養システムが 93.5 万円で、流水式連続培養システムが 55.3 万円となり、循

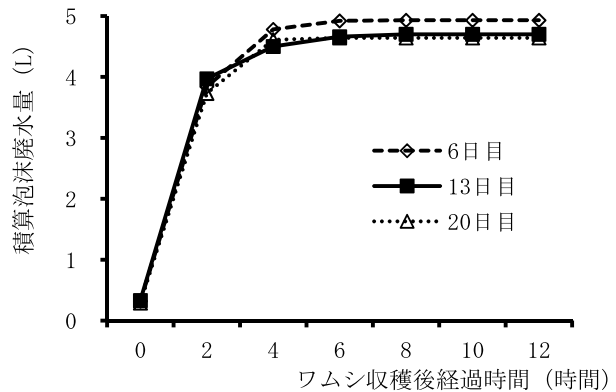


図 5. 循環 1 区におけるワムシ収穫後の積算泡沫廃水量の推移
横軸の数字は計測した経過時間を示し、収穫時の廃水が混合し安定する収穫 20 分後を「0」と定義し、以後 2 時間ごとに測定した
泡沫廃水量の「0」は、定義上の 0 時間後となる収穫後 20 分間までの泡沫廃水量を示す

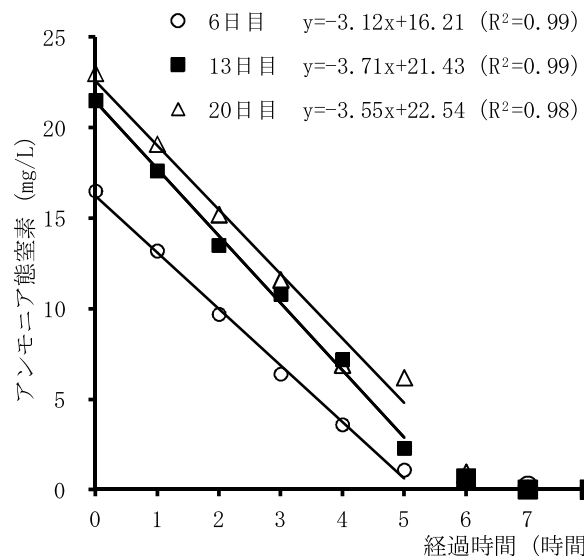


図 6. 循環 1 区におけるワムシ収穫後のアンモニア態窒素濃度の推移
横軸の数字は計測した経過時間を示し、アンモニア態窒素が安定する収穫 20 分後を「0」と定義し、以後 1 時間おきに測定した

環式連続培養システムが 38.2 万円高かった。一方、1 回の培養を 25 日とした場合の 1 回あたりのランニングコストは循環式連続培養システムが 10.1 万円で、流水式連続培養システムが 18.0 万円となり、人工海水粉末の使用量が少ない循環式連続培養システムが 7.9 万円安かった。このことにより、人工海水を用いた場合は 5 回の培養を行うと、コストがほぼ同額になり、6 回以上の培養になると循環式連続培養システムの方がコスト面で有利となることが示された。人工海水を用いない場合は、ランニングコストは両システムとも 7.8 万円であること

表 2. 循環 1 区におけるワムシ収穫後のアンモニア態窒素硝化速度

培養経過 日数	測定 時間 (h)	処理の水量 ^{*2}			測定開始時のアンモニア 態窒素濃度と重量		硝化 ^{*4} 速度 (g-N/h)	硝化 ^{*5} 完了時間 (h)
		平均水量 (kL)	測定開始時 (kL)	測定終了時 (kL)	濃度(mg/L)	重量(g) ^{*3}		
6日目	5	1.826	1.886	1.765	16.5	31.1	5.69	5.47
13日目	5	1.801	1.872	1.730	21.5	40.2	6.68	6.02
20日目	5	1.792	1.858	1.725	23.0	42.7	6.36	6.72

*1 アンモニア態窒素濃度が 1mg/L 以上であった時間を示した
 *2 *1 における培養水槽と収穫水槽を除いたシステムの水量を示した
 *3 d=b × c で算出した
 *4 図 6 に示した直線式の切片の絶対値に a を乗じて算出した
 *5 硝化完了時間 (f) =d/e で算出した

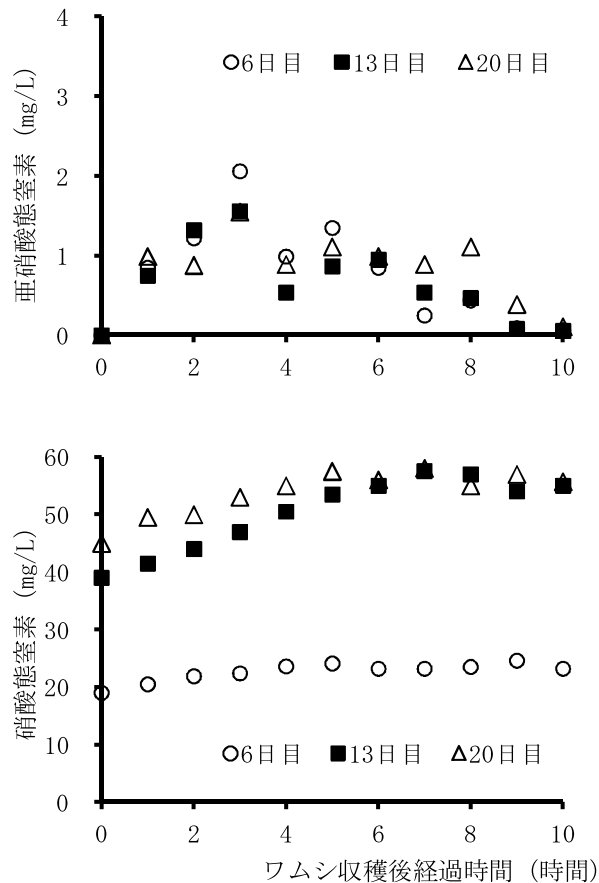


図 7. 循環 1 区におけるワムシ収穫後の亜硝酸・硝酸態窒素濃度の推移
 横軸の数字は計測した経過時間を示し、亜硝酸・硝酸態窒素が安定する収穫 20 分後を「0」と定義し、以後 1 時間おきに測定した

から、循環式連続培養システムではイニシャルコストが 38.2 万円新たに必要であった。

培養に関わる作業時間の測定結果は表 4 に示した。最も多くの時間を要する培養作業時間には両システムに差

表 3. 各システムのコスト試算結果

項目	金額 (千円)	
	循環式	流水式
イニシャルコスト		
培養水槽	*1 163	163
収穫水槽	*1 163	163
回収水槽	*2 56	16
泡沫分離装置	*3 137	-
生物ろ過装置	*4 216	-
給餌装置	*5 116	116
注水関連資材	*6 48	80
消耗品類	*7 38	17
小計	935	553
ランニングコスト		
クロレラ代	74	74
水道代	*8 1	4
人工海水粉末代	23	102
電気代	*9 3	-
小計	101	180
合計	1,036	733

循環式は循環 1 区、流水式は流水 1 区で試算した
 加温施設やブローア施設、土地代等の庁舎設置の固定資産、備品類及び、人件費は含めていない
 加温に関わる灯油代等は含めなかった

*1 1kL アルテミアふ化水槽の金額
 *2 循環 1 区は回収水槽、流水 1 区は回収容器の金額
 *3 泡沫分離器と循環ポンプの合計金額
 *4 水槽 2 基及び、循環ポンプ、バルブ、ろ材 (ろ材はサンゴ砂 380kg、親水性セラミックス 84kg とした)、ろ材用ネットの合計金額
 *5 給餌タンクと定量ポンプの合計金額
 *6 循環 1 区は流量計の金額、流水 1 区は注水ポンプ、バルブ、流量計の合計金額
 *7 循環 1 区はバルブ、塩ビ資材、マット、エアストーンの合計金額、流水 1 区は塩ビ資材、マット、エアストーンの合計金額
 *8 水道使用量と庁舎の契約料金から算出
 *9 ポンプの電力量と屋島庁舎の契約料金から算出

はなかった。循環式連続培養システムでは、新たな作業として加わるろ材の設置や熟成に作業時間を要するものの、流水式連続培養システムでは人工海水作製時間や注水用に用いた水槽の洗浄等の作業があるため、合計の作

表 4. 各システムの作業時間

作業項目	作業時間 (分)	
	循環式	流水式
ろ材の設置	25	-
ろ材の熟成	30	-
人工海水作製	38	91
培養	941	931
水槽洗浄	32	37
合計	1,066	1,059

業時間では循環式連続培養システム 1,066 時間、流水式連続培養システム 1,059 時間と差はなかった。

考 察

循環式連続培養システムの導入はワムシ培養における生産コスト低減や増殖阻害細菌の混入等の多くの問題を解決できるものと期待されるが、種苗生産現場への普及を考慮すると、システム自体が簡便であること、イニシャルコストやランニングコストが安価であること、さらに安定性や安全性に優れていること等が重要であると考えられる。本研究では、これらに配慮した新たな循環式培養システムを試作して 25 日間の連続培養を行ったところ、毎日約 17 億個体のワムシを安定生産することができ、流水式の培養法 (16.5 ~ 17.2 億個体/日) と遜色なくワムシの大量培養ができることを明らかにした。

循環式の培養で最も重要な点は、飼育生物の排泄物や死骸ならびに残餌等が原因で水中に蓄積するアンモニア態窒素等のワムシの増殖阻害物質を低レベルに制御することである^{24,26)}。特にワムシの培養水中には大量の懸濁物と高濃度のアンモニア態窒素が発生するため、この両方を効率よく除去できる装置を培養システム内に組み込む必要がある。その処理方法としては、前者には泡沫分離法、ドラムフィルター法、沈殿法などがあり、後者にはストリップング法、不連続点塩素処理法、イオン交換法、オゾン法、生物ろ過法等があるが²⁷⁾、ワムシ培養の観点から懸濁物の大半を占める微細粒子の除去に適した泡沫分離法と有毒物質の発生がなく構造が簡便である生物ろ過法の組み合わせが最も適していると考えられた。このため、循環式連続培養システムには循環水の浄化装置として、泡沫分離装置と生物ろ過装置を組み込んだ。採用した泡沫分離装置は、汎用性を考慮して市販品を使用したものの、その懸濁物除去能力は循環水中の懸濁物量を 2 時間で約 8 割、4 時間でほぼ全て除去することができ、短時間で効率よく懸濁物が除去できることが明らかとなった。一方、本システムでの生物ろ過装置は、ワムシ収穫後のアンモニア態窒素の硝化速度が 5.69 ~ 6.68g-N/h (ろ材 1L あたり 8.8 ~ 10.3mg-N/h) で、収

穫後 6 時間で 1mg/L 以下まで処理できることが示された。サンゴ砂、親水性セラミックスのアンモニア態窒素の硝化速度は、水温 22°C では 10.8mg-N/h/L、5.9mg-N/h/L とされており²⁸⁾、硝化能力は水温、pH、塩分等により変化することが知られている^{29,30)}。本システムでの生物ろ過装置は上記の硝化能力とろ材の比率から算出した 8.9mg-N/h/L と比べて硝化能力は遜色なく、約 6 時間という短時間でアンモニア態窒素が処理できることから、機能的に問題はなかったと考えられる。このようにシステムの高いアンモニア態窒素処理能力から、供給される循環水のアンモニア態窒素は低く抑えられたことにより、循環区の培養事例においても培養終了時のアンモニア態窒素が 53.0 ~ 70.5mg/L であり流水区 (64.0 ~ 98.0mg/L) と差はなかった。収穫後の循環水は短時間でアンモニア態窒素が除去されること、流水区の方で上昇した事例があることから、培養水槽のアンモニア態窒素の増加量に若干の差が生じるのは、システムの違いによる差ではなく、培養水槽の懸濁物の量や壁面等に付着すると考えられる硝化細菌の発生量の差と考えられる。さらに循環区では pH が若干低く推移したこともあり、有毒な非解離アンモニアの濃度は 1.4 ~ 1.5mg/L にとどまり、非解離アンモニア耐性が把握されている L 型ワムシの増殖可能濃度である 2.2mg/L²⁴⁾ を下回ったことから、本システムが効果的に機能したことが窺える。一方、亜硝酸態窒素では、流水区の 0.1mg/L 以下に対して、循環区は 0.6 ~ 1.2mg/L まで上昇したが、これは、ワムシ収穫直後の亜硝酸態窒素を含んだ循環水が培養水槽に入ったため蓄積したものと考えられるが、亜硝酸態窒素は弱毒性であり³¹⁾、蓄積量も僅かであるためワムシの培養には問題にならないレベルであった。これらのことから、本システムでは循環水中の懸濁物とアンモニア態窒素が比較的短時間で処理され、培養水槽のワムシの増殖阻害物質である非解離アンモニアの蓄積をある程度抑制できたことが、流水式の連続培養法と同程度の生産性が得られた要因と推察される。

循環式のワムシ培養では、培養に用いる水の量が少なくなるため、ワムシ培養に人工海水粉末を用いやすくなることから、海水の添加を介したワムシの増殖を阻害する細菌や飼育仔魚に対する病原性細菌の侵入機会が大幅に少なくなることで、ワムシ培養の安定性の向上や飼育仔魚の細菌性疾病の防除にも貢献する可能性が高い。ただ、病原性細菌の侵入経路は海水の添加のみで防除できるものではなく、今後は実証実験の繰り返しによる検証やワムシ卵消毒技術³²⁾の活用なども視野に入れて解明していくことが重要となる。循環式のワムシ培養は、加えて、従来から問題視されてきた大量の有機物を含むワムシ培養廃水についても、本実験での流水式の連続循環法では 1 日あたり 630L 前後の廃水が発生していたが、循環式の連続培養法では 1 日あたり 20L 程度と極めて少なく、高濃度の有機廃水を工業的に処理しやすい量と

なるため、沿岸海域の環境保全にも役立つものと推測される。また、循環式連続培養システムは新たな海水を全く使用しないことから、海水の確保が難しく、培養で大量に生じる廃水処理も困難な内陸部で特に効果的な培養方法であると考えられる。

コストの比較では、両システムでの作業時間、特に培養に関わる作業時間に大きな差は無いことから、循環式連続培養システムの導入により大幅な人件費の上昇は考えられにくい。そのため、人件費と後述する水温維持に関わる経費を除いたコストを比べると、本研究で試作した循環式連続培養システムは、イニシャルコストが93.5万円で、流水式連続培養システム(55.3万円)よりも高額であるものの、ヨーロッパで開発されたバッチ式の循環式培養システムの12,200ユーロ(約160万円)と比較して大幅に安価であった¹²⁾。海外事例では培養方式が違うこと、社会的背景から人件費を削減してオートメーション化に特化していることなど直接的なコスト比較はできないが、本研究で試作したシステムでは簡便かつコンパクトな設計重点をおいたことにより安価になったと考えている。一方で、ランニングコストは、人工海水粉末代を除いた両システムには差はなく、地先の海水を用いればイニシャルコストが高額な分、流水式の連続培養の方がコスト的に有利と考えられる。ただ、ワムシの培養は適温を維持するため加温されることが一般的で、培養時期や地理的立地条件によっては新水の補給がない循環式の連続培養の方が安価となる可能性はある。また、陸上養殖や疾病防除の観点から培養に人工海水粉末を用いた場合は、流水式の連続培養事例(培養期間が25日間)に比べて1事例あたり7.9万円安価になるため、同様な培養事例を繰り返し5回程度実施すれば、循環式の連続培養の方がコスト面で有利になると推測され、循環式連続培養システムの導入は、長期的にみるとワムシ生産コストの削減に貢献すると考えられる。そのため立地条件や疾病防除、廃水処理など培養環境の諸事情を総合的に判断した上での培養方法の選択が重要である。

以上のことから、本研究で試作した循環式連続培養システムは、ワムシの生産コストの削減に有効な可能性も高く、さらにワムシの培養の安定性の向上や疾病防除、環境保全等、その効果が多岐にわたる可能性がある。

謝 辞

本研究を行うにあたり、システムの設置およびワムシ管理にご協力いただきました独立行政法人水産総合研究センター瀬戸内海区水産研究所屋島庁舎の職員、契約職員の皆様に深謝いたします。

文 献

- 1) 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** (4), 473-478.
- 2) MARUYAMA, I., Y. ANDO, T. MAEDA, and K. HIRAYAMA (1989) Uptake of Vitamin B12 by various stains of unicellular algae *Chlorella*, *Nippon Suisan Gakkaishi*, **55**, 1785-1790.
- 3) 日野明徳(1998)ワムシ連続培養装置. アクアネット, **1**, 45-48.
- 4) FU, Y., A. HADA, T. YAMASHITA, Y. YOSHIDA, and A. HINO (1997) Development of a continuous culture system for stable mass production of the marine rotifer *Brachionus*, *Hydrobiologia*, **358**, 145-151.
- 5) 社団法人日本栽培漁業協会(2000)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, **6**, 119-126pp.
- 6) YU, J.-P., A. HINO, T. NOGUCHI, and H. WAKABAYASHI (1990) Toxicity of *Vibrio alginolyticus* on the survival of the rotifer *Brachionus plicatilis*, *Nippon Suisan Gakkaishi*, **56**, 1455-1460.
- 7) CHENG, S. H., T. SUZAKI, and A. HINO (1997) Lethality of the heliozoon *Oxnerella maritima* on the rotifer *Brachionus rotundiformis*, *Fisheries Science*, **63**, 543-546.
- 8) 増村和彦・安信秀樹・岡田直子・室賀清邦(1989)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, **24**, 135-141.
- 9) 岩田一夫・矢野原良民・石橋 制(1978)マダイの種苗生産過程におけるへい死要因に関する研究. 魚病研究, **13**, 97-102.
- 10) 楠田理一・横山 淳・川合研児(1986)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. 日水誌, **52**, 1745-1751.
- 11) 田谷全康・室賀清邦・杉山瑛之・平本義春(1985)種苗生産過程の仔稚アユからの *Vibrio anguillarum* の検出. 水産増殖, **33**, 59-66.
- 12) SUANTIKA, G., P. DHERT, E. OBRIEN, and P. SORGRLOOS (2003) Technical and economical feasibility of a rotifer recirculation system, *Aquaculture*, **227**, 173-189.
- 13) 山本義久(2011)閉鎖循環飼育の「システム」の在り方, 閉鎖循環飼育の未来と可能性第2回. アクアネット, **5**, 44-47.
- 14) 山本義久(2011)閉鎖循環式種苗生産に適した物理ろ過方法, 閉鎖循環飼育の未来と可能性第3回. アクアネット, **7**, 60-65.
- 15) 山本義久(2011)閉鎖循環式種苗生産に適した生物ろ過装置(上), 閉鎖循環飼育の未来と可能性第4回. アクアネット, **9**, 66-70.
- 16) 山本義久(2011)閉鎖循環式種苗生産に適した生物ろ過装置(下), 閉鎖循環飼育の未来と可能性第5回. アクアネット, **11**, 68-73.
- 17) 丸山俊朗・鈴木祥広・佐藤大輔・神田 猛・道下 保(1999)泡沫分離・硝化システムによるヒラメの閉鎖循環式高密度飼育. 日水誌, **65**, 818-825.
- 18) 鴨志田正晃・山崎英樹・山本義久(2006)閉鎖循環システムを用いたマダイの種苗生産. 栽培技研, **33**, 67-76.
- 19) 野原節雄(2009)「青の革命」で注目される陸上養殖 日本初, 閉鎖循環式屋内型エビ生産システムの開発. 水産界, **1497**, 17-20.
- 20) 今井 正・荒井大介・森田哲男・小金隆之・山本義久・千

- 田直美・遠藤雅人・竹内俊郎（2010）閉鎖循環式種苗生産におけるトラフグの成長，生残および飼育水の浄化に及ぼす低塩分の影響。水産増殖，**58**，373-380.
- 21) 小磯雅彦（2007）平成23年度栽培漁業技術研究会テキスト集－省力化・省エネ化・低コスト化に役立つ増養殖技術－，安定的かつ効率的なワムシ大量培養のための培養管理技術，2-5pp.
- 22) 菊池弘太郎（2004）閉鎖循環型養殖における水処理技術。養殖・畜養システムと水管理（矢田貞美編著），恒星社厚生閣，東京，39-67pp.
- 23) BOWER, C. E. and P. BIDWELL（1978）Ionization of ammonia in seawater: Effect of temperature, pH and salinity, *J. Fish. Res. Bd. Can.*, **35**, 1012-1016.
- 24) YU, J.- P., A. , and K. HIRAYAMA（1986）The effect of unionized ammonia on the population growth of the rotifer in mass culture, *Nippon Suisan Gakkaishi*, **52**, 1509-1513.
- 25) BENTLEY, C. D., P. M. CALLOLL, and W. O. WATANABE（2008）Intensive Rotifer Production in a Pilot-scale Continuous Culture Recirculating System Using Nonviable Microalgae and an Ammonia Neutralizer, *Journal of the World Aquaculture Society*, **39**, 625-635.
- 26) 吉村研治・北島 力・宮本義次・岸本源次（1994）濃縮淡水クロレラ給餌によるシオミズツボワムシの高密度培養における増殖阻害要因について。日水誌，**60**，207-213.
- 27) 菊池弘太郎（1999）循環型養殖システムにおける負荷低減。水産養殖とゼロエミッション研究（日野明徳・丸山俊朗・黒倉寿編著），恒星社厚生閣，東京，64-76pp.
- 28) 山本義久・荒井大介（2009）マダイを対象とした閉鎖系循環飼育－Ⅲ～種苗生産段階に適したろ材の探索～。栽培セ技報，**9**，27-31.
- 29) 河合 章・吉田陽一・木俣正夫（1964）循環濾過式飼育水槽の微生物化学的研究-I 魚の飼育に伴う水質ならびに微生物相の変化について。日水誌，**30**，55-62.
- 30) 河合 章・吉田陽一・木俣正夫（1965）循環濾過式飼育水槽の微生物化学的研究-II 濾過砂の硝酸化成作用について。日水誌，**31**，65-71.
- 31) OSTRENSKY, A.（1993）Acute Toxicity of Nitrite to Rotifer *Brachionus plicatilis*, *Arquivos de Biologia e Tecnologia*, **36**, 125-132.
- 32) 渡辺研一・篠崎大祐・小磯雅彦・桑田 博・吉水 守（2005）シオミズツボワムシ複相単性生殖卵の消毒。日水誌，**71**，294-298.