

機関番号：34419

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20580088

研究課題名（和文） 資源管理型漁業のための微生物餌料とその利用技術の開発

研究課題名（英文） Development of microbial food and the high efficiency culture method for fish and crustacean larvae in mariculture

研究代表者

田中 賢二（TANAKA KENJI）

近畿大学・産業理工学部・教授

研究者番号：20236582

研究成果の概要（和文）：

養殖や栽培漁業における餌料動物プランクトン“L型ワムシ”の生産効率化のために高密度培養法を開発した。pH自動制御法を用いて増殖阻害因子である非解離型アンモニアの蓄積を抑制する等の効果により、ビタミンB<sub>12</sub>含有濃縮淡水クロレラ給餌下でL型ワムシの増殖密度を従来法の数十倍から100倍近い30,000個体/mL以上に高めることに成功した。また、独自に分離したビタミンB<sub>12</sub>生産菌がワムシ生産における低コストな餌料として利用可能なことを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

To improve the efficiency in production of marine zoo plankton, L-type rotifer as live food for fish and crustacean larvae, high density culture method was developed. The high density cultivation which was mainly constituted of pH control to promote dissociation of toxic NH<sub>3</sub> to harmless NH<sub>4</sub><sup>+</sup> enabled to increase population density of L-type rotifer over 30,000 ind/ml, which was about 100 times higher than those obtained by usual culture method that have been reported previously. Vitamin B<sub>12</sub>-producing bacteria isolated in our laboratory as low cost food for rotifer was also investigated and the result showed that they are useful.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2009年度	800,000	240,000	1,040,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	2,500,000	750,000	3,250,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・応用微生物学

キーワード：ワムシ、初期餌料生物、*Brachinous plicatilis*、高密度培養

## 1. 研究開始当初の背景

現在市場で流通する魚の多くは、栽培漁業や養殖において“生産”されたものである。栽培漁業は、魚介類の仔稚魚を飼育して種苗として大量に放流し、天然水産資源の回復を図る環境調和型の管理漁業である。各地の種

苗生産機関では、唯一の初期餌料である海産動物プランクトン“シオミズツボワムシ”（以下ワムシと称す）を調達するため、自家培養により毎日100億個体もワムシを生産しているが、旧来の生産方法は極めて非効率であり、このことが養殖や栽培漁業の大きな障壁に

なっていた。申請者は、微生物培養工学の技術を利用することによって、海産小型ワムシ *Brachionus rotundiformis* (以下 S 型ワムシと称する) を従来法の 100 倍すなわち海水 1 ml あたり 20,000 個体もの高密度まで増殖させる培養方法を確立した。この高密度培養法により S 型ワムシ生産効率は飛躍的に向上し、現在、国内外の多くの種苗生産機関で我々の高密度培養法が使用されている。(なお、この研究に対して平成 14 年度に(社)日本生物工学会より技術賞が授与された)。

ワムシ生産効率化の次なる課題は、使用餌料のコストダウンと大型ワムシ高密度培養法の開発である。ワムシ生産ではビタミン B<sub>12</sub> を細胞内に含有させた市販の濃縮淡水クロレラが餌料として用いられているが、その価格は 20L 当たり数万円と高価であり、今ではワムシ生産コストの大半をビタミン B<sub>12</sub> 含有クロレラが占めている。一方、S 型よりも個体サイズが数倍大きな“L 型”ワムシ *Brachionus plicatilis* はブリやヒラメなど大型仔稚魚の飼育に不可欠な餌料であり、需要が高いにもかかわらず培養が容易でないため、その生産は依然として低個体密度で大規模水槽を使うやり方で行われている。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、資源管理型漁業に不可欠な初期餌料動物プランクトン“L 型ワムシ”の生産効率化を図るため、ビタミン B<sub>12</sub> 含有濃縮淡水クロレラを用いて L 型ワムシ高密度培養法を開発し、さらにビタミン B<sub>12</sub> 産生細菌を利用して濃縮淡水クロレラの代替となりうる低コストのワムシ用細菌餌料の開発を行うものである。

本研究では、海産初期餌料大型動物プランクトンである L 型ワムシの高密度培養法を開発し、さらに L 型ワムシの餌料として現在用いられている市販濃縮淡水クロレラに替わる安価な細菌餌料を開発する。そして、高密度培養法と細菌餌料を組み合わせることにより、L 型ワムシの効率的な大量生産法確立を試みる。

高密度培養法開発のための研究では、L 型ワムシの増殖阻害要因とその影響を明らかにし、最適な培養条件を維持するための培養制御法を工夫することによって L 型ワムシ培養の高密度化を図る。とくに、最適な溶存酸素濃度を維持するための酸素ガス通気法と、

ワムシの代謝産物であり強い増殖阻害作用を有する NH<sub>3</sub> を阻害作用の小さな NH<sub>4</sub><sup>+</sup> に解離を促進させるための pH 制御法について検討を行う。これらの試験結果をもとに L 型ワムシの増殖環境を最適に保つ培養システムを構築し、高密度培養試験を行う。

細菌餌料の研究では、独自に分離したビタミン B<sub>12</sub> 産生菌株多数からまずビタミン B<sub>12</sub> 高生産株を選出する。そのなかから L 型ワムシに給餌した時に最も良好な増殖を与える菌株を選択し、この細菌菌体の最適な給餌量を明らかにすることとした。さらに、主要タンパク源として安価な市販搾パン酵母をこのビタミン B<sub>12</sub> 産生菌と併用給餌することによってワムシ増殖密度の増大を図る。

最後に高密度培養法において、濃縮淡水クロレラの代わりにビタミン B<sub>12</sub> 産生細菌とパン酵母を給餌することによって L 型ワムシがどのくらいの個体密度まで増殖できるか試験を行った。

## 3. 研究の方法

(1) 使用ワムシ株：本研究では一貫して水産総合研究所能登島栽培漁業センターより分譲された L 型ワムシ *Brachionus plicatilis* (近大小浜株) を継代培養し種ワムシとして使用した。

(2) 高密度培養試験方法の概略： 温度制御が可能な水槽を使って、ビタミン B<sub>12</sub> を含有させた市販濃縮淡水クロレラ (VB12、クロレラ工業社製) を所定量給餌し、空気通気することによって L 型ワムシを増殖させた。温度、培養海水の塩分、クロレラ給餌量、制御 pH 等の培養条件を変えることによって、その時のワムシ個体群密度、携卵数、ワムシの皮甲長を計数し、また培養水のアンモニア濃度や DO、細菌数など培養環境の変化も測定した。L 型ワムシ 1 個体あたりの呼吸速度も測定し、これに培養環境が及ぼす影響も調べた。

(3) ビタミン B<sub>12</sub> 細菌の給餌によるワムシ培養： 我々は以前、L 型ワムシを硫酸コバルト添加、蛍光灯照射下で培養した際に、ビタミン B<sub>12</sub> を含有しない淡水クロレラを給餌してもワムシが増殖することを見出した。そして、ワムシ培養水中には多数のビタミン B<sub>12</sub> 産生細菌が出現することを明らかにした。これらビタミン B<sub>12</sub> 産生細菌を多数分離しグリセロールストックにて -80℃ で保存して

いた菌株群から乳酸菌 *Lactobacillus delbrueckii subsp. lactis* NBRC3376 を用いたバイオアッセイによりビタミン B<sub>12</sub> の蓄積量が多い菌株を選出した。これらビタミン B<sub>12</sub> 高産生の菌株を ZoBell 培地で培養し得られた菌体を餌料として投与することにより L 型ワムシの増殖を調べた。

#### 4. 研究成果

まず、ビタミン B<sub>12</sub> を含有する濃縮淡水クロレラを給餌下で、1%~4%の範囲で培養海水の塩分濃度を変えて L 型ワムシの培養試験を行った。結果として、試験に用いた近大小浜株の至適塩分濃度は 1%~1.5%の範囲内にあることが分かった。同様に、温度を変えて培養試験を行ったところ、至適温度は S 型ワムシよりずっと低い 24℃付近にあることが分かった。試験に用いた L 型ワムシ株の至適塩分・温度ともに、これまで他の研究者によって報告されている L 型ワムシのそれと同じであることが確認された。従って、以降の培養試験は全て 24℃、塩分 1.5%で行うこととした。また、溶存酸素の不足が L 型ワムシにとって致命的であることを考え、L 型ワムシの増殖可能な“臨海溶存酸素濃度”を検討し、これは S 型ワムシとほぼ同じレベルにあることを確認した。また、培養系の酸素消費量を把握する必要があることから、L 型ワムシの呼吸速度を測定した。プランクトンネットで濃縮したワムシ海水を用いて、培養水槽に出入りする空気の酸素減少量から呼吸速度を求めた結果、1 個体あたりの呼吸速度は、餌であるクロレラの存在下では急激に増加し、給餌によって摂食活動や消化が活性化されることを示唆した。また、アンモニウム塩の添加によって呼吸速度は急激に低下した。排泄物であるアンモニアは中和された塩の形であっても毒性が強く、作用は迅速であり、代謝活動を著しく抑制することが明らかになった。また、餌料である濃縮淡水クロレラもまた無視できない量の溶存酸素を消費することが明らかになった。これらの結果は、やはり L 型ワムシの高密度培養においても、1 日あたり必要な量のクロレラを一度に給餌することは培養系の酸欠を招きワムシの増殖に良くないこと、また有害な非解離型 NH<sub>3</sub> 抑制のため、塩酸の自動添加による pH の一定制御が必要であることを示唆している。

以上の結果をもとに pH 一定制御による L

型ワムシ高密度培養試験を行った。1 L 水槽において pH コントローラを用いて 1 M HCl を自動添加することにより培養中の pH を 7.0 に維持した。1 日のクロレラ給餌量を数回に分けて行うことにより、ワムシ呼吸活性の増大による溶存酸素濃度の減少を抑えた結果、回分培養での L 型ワムシの増殖密度は数千個体/mL にまで増大した。しかしながら、それ以上の増殖密度の上昇は見られなかったため、高密度培養ではクロレラの不足が起きているのではないかと考え、下記の式で算出していた 1 日あたりのクロレラ給餌量を 1.5 倍に増やして培養試験を行った。

$$\begin{aligned} \text{Feed amount of Chlorella paste (ml/day)} \\ &= \text{L-type rotifer density(ind/ml)} \times \text{culture} \\ &\quad \text{volume (ml)} \times 1.5 \times 10^5 \\ &\quad \text{cells} \div (1.5 \times 10^{10} \text{ cells/ml}) \\ &= \text{L-type rotifer density(ind/ml)} \times \text{culture} \\ &\quad \text{volume (ml)} \times 10^{-5} \dots (1) \end{aligned}$$

その結果、L 型ワムシの増殖密度は最大で 34,600 ind/mL にまで増大した。(Fig.1)。これは従来報告されてきた L 型ワムシの増殖密度の数十倍~100 倍にも相当する。

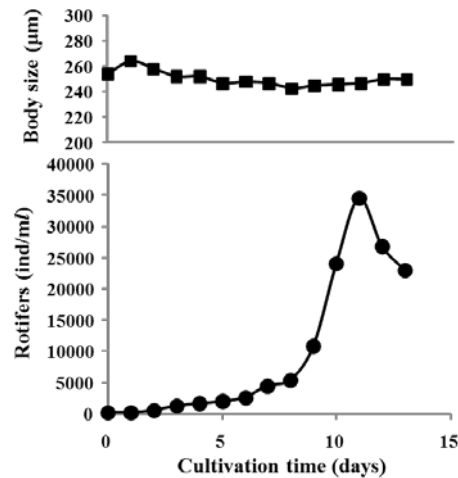
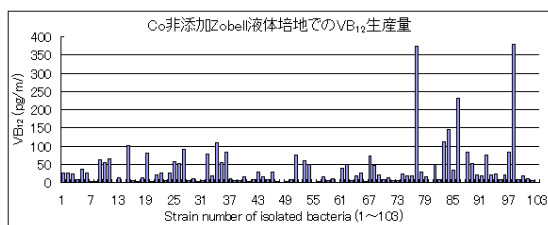


Fig.1 Growth of L-type rotifer in high density culture by maintaining culture pH at 7.0 and increasing the feeding ratio of *Chlorella* cells for rotifer from  $15 \times 10^4$  algae cells/rotifer/day to  $22.5 \times 10^4$  algae cells/rotifer/day.

しかしながら、本試験では 1 L 規模の水槽で試験を行っており水槽内環境要因の変動が大きい場合、実験結果（増殖密度）が一定していない。また、クロレラ給餌量を増やしたためか、残餌等に起因する培養水の汚れ（懸濁物質）がひどく、細菌数も多くなっ

ていた。商業的規模の培養では、水槽を1トン規模に拡張できるため水槽内の環境変動による影響が幾分緩和されるとともに、定量ポンプの導入によりクロレラを常時少量ずつ給餌することが可能になるので汚れの問題もある程度解決できるのではないかと期待される。

以前我々は、硫酸コバルト添加と光照射下でビタミン B<sub>12</sub> を含有しないクロレラ給餌給餌によりL型ワムシを増殖させることに成功している。その際の培養水から平板コロニー法により分離し-80 で保存していた細菌103株について、バイオアッセイによりビタミン B<sub>12</sub> の産生能を調べた。結果を次のグラフに示す。



分離株の多くがビタミン B<sub>12</sub> を生産しているのが確認され、とくに4つの菌株において極めて高いビタミン B<sub>12</sub> 生産量が見られた。そこで、これら4株を硫酸コバルトを添加したZoBell培地で培養し得られた菌体を、L型ワムシ(密度10個体/mL)に投与して増殖を調べた。しかしながら、菌体給餌のみではワムシ増殖が見られなかったため、市販生パン酵母を0.1g/L/dayの割合で併用給餌したところ、個体群密度で100~150id/mLのワムシの増殖が見られた。(生パン酵母のみの給餌ではワムシの増殖は見られず)。従って、ビタミン B<sub>12</sub> 産生分離菌はL型ワムシの餌料生物もしくは栄養強化生物になるうことが確認された。細菌給餌による今回の試験では、高いワムシ増殖密度は得られなかったが、細菌給餌に関しては光照射の影響、とくに光の波長と光量(光量子束密度と照射照度)の影響が大きいと思われる。また、生パン酵母がなぜ必要かについても説明が待たれる。基盤研究(C)の補助による研究は2010年度で終了したが、細菌餌料と光照射の影響についてはLED照射装置を導入することによって今後より詳細な研究を継続する予定である。LED光は白熱灯や蛍光灯照射よりもエネルギー効率に優れているので、L型ワムシの大量生産に光を用いる場合にはエネルギーコ

ストの低減も可能であると期待される。すでに、LED光照射・ビタミン B<sub>12</sub> 含有クロレラ給餌の培養において、ある特定波長の光照射下でワムシの増殖が最も良くなること、ある光量までは光量が大きくなるにつれてワムシ増殖密度は高くなること、最適な光量子束密度が存在すること、そして生パン酵母のみを給餌する培養でも光照射条件を改善することによってワムシ増殖密度が飛躍的に向上することを掴んでいる。(非照射ではほとんど増殖しない)。今後の研究の進展が大いに期待される。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計2件)

- ① Takao Yoshimatsu, Takahiro Higuchi, Yuji Hamasaki, and Kenji Tanaka. Preliminary trials on the effect of lighting for the population growth of the rotifer, *Brachionus plicatilis*. Japan Agricultural Research Quarterly. Vol.42, No.2, 131-136. 2008 (査読有)
- ② Kenji Tanaka, Hiroyuki Takahashi1, Yuji Hamasaki1 and Takao Yoshimatsu. High density culture of marine zooplankton, *Brachionus plicatilis* as initial food organism for aquaculture. Current Topics in Biotechnology. Vol, 4, 41-46. 2008 (査読有)

[学会発表] (計4件)

- ① 相馬さやか、後藤進介、中村誠、田中賢二. たらこにおける細菌の亜硝酸根生成とその抑制に関する研究. 日本食品科学工学会第57回大会、2010年9月2日、東京.
- ② 渡邊美沙子、田中賢二. 初期餌料生物 *Brachionus plicatilis* 生産の高密度化技術の開発. 近畿大学サイエンスネットワーク・院生サミット、2009年11月14日、東大阪市.
- ③ 相馬さやか、三池美佳、中村誠、田中賢二. たらこから分離した細菌の亜硝酸根

生成能について. 日本食品科学工学会第  
56 回大会. 2009 年 9 月 10 日-12 日、名  
古屋市.

- ④ 渡邊美沙子、田中賢二. 高密度培養にお  
ける海産餌料プランクトン S 型ワムシと  
L 型ワムシの増殖特性の違い. 第 45 回  
化学関連支部合同九州大会、2008 年 7 月  
5 日、北九州市.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

田中 賢二 (TANAKA KENJI)  
近畿大学・産業理工学部・教授  
研究者番号：20236582

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：