

資 料

淡水ワムシ  
(ツボワムシ *Brachionus calyciflorus* PALLAS)  
大量培養マニュアル

太田滋規・幡野真隆・三枝仁・久米弘人・白杵崇広・根本守仁・関 慎介・磯田能年

Massculture manual of the fresh water rotifer  
*Brachionus calyciflorus* PALLAS

Shigeki Ota・Masataka Hatano・Jin Saegusa・Hiroto Kume・Takahiro Usuki・  
Morihiro Nemoto・Shinsuke Seki・Takane Isoda

目 次

緒言	155	モスタット式間引き培養) / 連続培養と改良間引き培養の長所および短所 / 培養槽および収穫槽 / 用水および注水方法 / 収穫率 (=注水率、希釈率) / 給餌方法 / 通気 / 水温管理 / その他
用語の説明および定義	156	
1 ツボワムシの生物学的特性	158	2.2.4.3 連続培養の運転工程
1.1 ツボワムシ	158	174
1.2 生活史	158	2.2.4.4 連続培養の毎日の作業
1.3 滋賀水試株の形態	159	175
携帯卵の形状による雌の区別と雄 / 形態の変異 / 大きさ		水質測定およびワムシ密度、残餌密度の計数 / 給餌 / 収穫 / 懸濁物除去フィルターの洗浄
1.4 株	160	2.2.4.5 培養不調時の現象および原因
従来株と滋賀水試株の違い		176
1.5 滋賀水試株の水温別増殖特性	161	繊毛虫等の原生動物等の大增殖 / 雌卵携卵個体の異常増加 / 携卵個体率の低下 / 両性生殖雌の増加 / 泡の発生 / 微小な懸濁物 / 後側方棘の長い個体の発生 / 直射日光 / 気圧の急低下
2 淡水ワムシの大量培養	163	2.2.5 ツボワムシ培養事例
2.1 これまでの淡水ワムシの培養方法 (施肥培養)	163	178
2.2 新しい培養方法 (連続培養)	165	2.2.5.1 拡大培養事例
2.2.1 培養工程	165	178
2.2.2 大量培養のための準備と管理方法	165	10L 槽拡大培養 / 100L 槽ケモスタット式拡大培養
2.2.2.1 ツボワムシの分離方法	165	2.2.5.2 連続培養事例
2.2.2.2 株の保存方法	166	179
2.2.2.3 ツボワムシ培養の餌料種類	166	100L 槽連続培養 / 1000L 槽連続培養
クラミドモナス / 淡水クロレラ / イースト (パン酵母)		2.2.5.3 改良間引き培養事例
2.2.2.4 計数法	167	183
ツボワムシ個体数密度の計数法 / 残餌密度の計数法		100L 槽改良間引き培養 / 800L 槽改良間引き培養 / 1000L 槽改良間引き培養
2.2.2.5 水槽と用水の塩素消毒	168	2.2.5.4 その他の培養事例
2.2.3 拡大培養	169	191
2.2.3.1 10L 槽拡大培養	169	100L 槽超高密度培養
2.2.3.2 100L 槽ケモスタット式 拡大培養	169	
2.2.4 連続培養	170	3 餌料としての培養ツボワムシ
2.2.4.1 連続培養の考え方	170	193
ワムシの連続培養とは / ワムシ培養でのタービドスタット / ワムシ培養でのケモスタット		3.1 培養ツボワムシの成分分析
2.2.4.2 基本構成および管理方法	171	193
連続培養 / 改良間引き培養 (ケ		3.2 栽培漁業対象コイ科魚類3種の 培養ツボワムシ給餌の効果
		194
		4 今後の課題
		195
		謝辞
		195
		文献
		196

## 緒 言

ツボワムシを含む淡水のワムシ類は本県の栽培漁業対象種であるホンモロコ、ニゴロブナ、ゲンゴロウブナ、ワタカ等のコイ科魚類の初期餌料として非常に重要であり、これらの培養が種苗生産の成否を左右すると言っても過言ではない。

一般的にコイやフナ類等の種苗生産は、池に肥料を加えて「水作り」を行い、ワムシ類やミジンコ類が増殖したところへ仔魚を収容するという、いわゆる同槽式飼育で初期餌料の確保が行われてきた。すなわち、これまでの淡水ワムシ培養は、屋外餌料培養池に肥料を添加して植物プランクトンを増殖させ、底泥中の耐久卵からふ化したワムシ類がそれらを餌料として増殖するという粗放的な培養（以後この方法を施肥培養と称す）であった。また、淡水ワムシの単種での大量培養は、伊藤<sup>1)</sup>によりアユの初期餌料としてツボワムシの有効性が確認された後、1960年代中頃に農業用肥料を用いた屋外池による大量培養が試みられている<sup>2)-4)</sup>。

一方、養鱈池に異常繁殖し、“水変わり”を起こす有害生物であった汽水種のシオミズツボワムシは、伊藤<sup>5)</sup>により海産魚の初期餌料として使用することが提唱された。その後、1964年頃に平田<sup>6)</sup>の開発した屋島増地によるナンノクロブシス培養とあわせて、1960年代半ばから日本全国の海産魚の初期餌料として用いられるようになった。1960年代に始まった海産魚類の大量種苗生産は、海産ワムシ類の大量培養技術の進歩と共に躍進した。その後、海産ワムシ類の培養に関する基礎生物学上、微生物生態学上、応用科学上等様々な研究が行われ<sup>7)</sup>、1990年代に開発された“連続培養法<sup>8)</sup>”により高密度、高効率でしかも作業性に優れ、安定した培養法が完成された。

海産ワムシ類の培養に関する研究は、前述の通り、その必要性から全国（全世界）で活発に行われた。しかし、淡水種のツボワムシ培養は、アユの初期餌料にシオミズツボワムシを利用するようになってからは、大量培養の必要性は乏しくなり、その後の大量培養研究はほとんど見られず、ただ、困難であるという漠然とした認識が残っただけで、技術開発は停滞している。

しかし、滋賀県は漁業法上海面である琵琶湖を有

し、栽培漁業としてニゴロブナ、ホンモロコ等の種苗放流を数百万尾規模で行っており、これらの種苗生産に初期餌料として用いられるワムシ類の安定大量培養は重要な課題であった。これまでの施肥培養では天候次第で安定性に欠けるため、種苗生産の計画数量や計画成長が達成できないこともあった。

そこで今回、海産ワムシ類の連続培養法を応用した結果、ツボワムシの安定生産が可能になったため、これまでの施肥培養から高密度連続培養までの淡水ワムシ培養技術をマニュアルとして報告する。

本マニュアルの構成は、始めに培養の対象であるツボワムシの生物学的特性と株の増殖特性を述べた。次に大量培養方法として、これまでの施肥培養の方法と事例、長所および短所を紹介し、その後新しく開発したツボワムシの連続培養の考え方や方法および事例をまとめた。なお、事例は良好な事例やマニュアルへとつながる失敗事例を選んで紹介した。最後に、培養ツボワムシの成分分析と給餌飼育試験により初期餌料としての有効性を述べた。本マニュアルは現時点でのツボワムシ培養をまとめたもので、安定大量培養というにはまだまだ不完全なものであり、今後さらなる改良を加え、効率的で安定した培養となることを願う。

## 用語の説明および定義

用語は主に「海産ワムシ類の培養ガイドブック」の用語の定義<sup>9)</sup>に従った。

- ① **海産ワムシ類・シオミズツボワムシ**：従来シオミズツボワムシのL型、S型とタイプ分けされていたが、L型ワムシはシオミズツボワムシ *Brachionus plicatilis*、S型ワムシは和名未定 *Brachionus rotundiformis* で別種とされている。本マニュアルでは、文献上でシオミズツボワムシあるいは *Brachionus plicatilis* と記載されているものは、「シオミズツボワムシ」とし、両種をまとめて記載されている場合には「海産ワムシ類」とした。
- ② **背甲長**：ワムシの大きさを表すため、背甲の長さを計測したもの（図1）。ワムシは卵からふ化後成長するため、個体群の特性を背甲長で表す場合には、成熟個体である携卵個体の背甲長を計測することが一般的である。



図1 ツボワムシの背甲長の測定部位

- ③ **ワムシ個体数**：雌ワムシの個体数を示す。
- ④ **ワムシ密度**：雌ワムシの1mL中の個体数を示す。
- ⑤ **培養日数**：本マニュアルでは培養開始日（接種日）を0日目として表記する。
- ⑥ **株保存培養**：株の特性を維持できる状態の培養を称する。本マニュアルではツボワムシの単種培養を行うため、分離したツボワムシの株を培養室等で継続培養することを指す。
- ⑦ **拡大培養**：株保存培養から大量培養の元種として供給できる個体数まで増やしていく培養を称する。
- ⑧ **バッチ培養（植え継ぎ培養）**：海産ワムシ類培養の従来法で、1回の培養の途中での間引きや注水を行わない培養方法。低密度で接種したワムシが増殖した後、培養槽の全てを収穫する。そして、その一部を次の培養の元種として植え継ぎ、数個

の水槽で順々に培養を繰り返す。比較的、小型水槽で高密度の培養を行うことが多い。本マニュアルにおける拡大培養はこの方法で行う。

- ⑨ **間引き培養**：海産ワムシ類培養の従来法で、連日または数日ごとに全ワムシの数分の一ずつを培養水ごとに取り出して収穫し、同量の用水を注水する培養方法。比較的、大型水槽で低密度の培養を長期に行われることが多い。この方法に高収穫率、連続注水、連続給餌およびケモスタット管理を加えたものが改良間引き培養である。
- ⑩ **連続培養**：海産ワムシ類培養の新しく開発された方法で、連続的な注水と等量の抜き取りによる収穫および連続的な給餌を行う培養法である。連続培養は主に細菌の培養に用いられ、タービドスタットとケモスタットという2つの方式がある。
- ⑪ **タービドスタット<sup>10)</sup>**：菌の濃度を培養液の濁度によってモニターし、菌の増殖速度に合わせて培地を加えつつ、同量の培養液を取り出すことにより、菌の濃度を一定に保つ方法。菌はその培地での最大の成長で増殖する。
- ⑫ **ケモスタット<sup>11)</sup>**：培養液の供給速度をあらかじめ所定の一定値に保持する方法で、微生物の増殖と供給培地による希釈とが釣りあうところで、安定的な定常状態が達成される。流入培養液は必要な栄養物の全てを含んでおり、そのうちの1成分のみが増殖を律速し、定常状態では、菌体、栄養物および代謝生産物などの濃度が一定に保持される。
- ⑬ **ケモスタット式給餌管理**：連続培養のケモスタット管理のうち給餌方法のみをこの管理で行う。すなわち、ワムシ密度に関わらず、一定値あるいは増殖率にあわせた給餌量を給餌する。この方法ではワムシは給餌量に応じて増殖するため、個体あたりの給餌量（=給餌率）を考慮する必要がなく、極めて管理が容易となる。一方、ワムシ密度に応じて給餌量を調整する方法では、例えば、ワムシ密度が低下した時に密度に応じて給餌量を減少させると、さらにワムシの増殖率は低下し密度は低下するというように、密度変化を助長する悪循環に陥る可能性がある。
- ⑭ **装置連続培養**：（社）マリノフォーラム21によって開発された閉鎖系の自動培養装置を用いた海産ワムシ類の連続培養を称す。閉鎖系の装置により

ワムシ培養の破綻要因は極力排除され、集約的で作業性に優れ、安定的な培養ができる。ただし、装置が非常に高価である。ツボワムシ培養についての事例はない。

⑭粗放連続培養：既存の水槽を用いて開放系ながら連続給餌と連続注水によって行う粗放的な連続培養である。特定の装置を使用していないため、1. 大次第で安価な装置を作製できる。本マニュアルのツボワムシの連続培養は、前記の自動培養装置を用いていないことと、完全な閉鎖系の装置ではないため、この方法に分類される。

⑮増殖率：ワムシは環境抵抗がない好適条件では指数関数的な増殖をボす (図 2)。ワムシ培養はこのような好適条件で行うべきであるから、増殖状態も指数関数として把握することが望ましい。このため、連続培養では指数関数である比増殖率で増殖率が示される。一方、海産ワムシ類培養の従来法では、前日から増えたワムシ個体数の割合を示す日間増殖率として管理されてきた。比増殖率と日間増殖率の関係は以下となる。

$$\text{比増殖率}(r) = h + \ln(N_t/N_0) / t$$

$N_0$ ：収容Hのワムシ密度

$N_t$ ：t日後のワムシ密度

t：日数

h：収穫率 (連続培養以外は0)

$\ln$ ：自然対数

例えば、比増殖率 r が 1 のとき、密度は 1 日に約 2.7 倍になる。

$$\text{日間増殖率}(\%) = (N_t - N_0) / N_0 \times 100$$

$$= (e^r - 1) \times 100$$

e：自然対数の底

例えば、1 日で 2 倍の密度に増殖した場合は、日間増殖率は 100% となり、比増殖率は約 0.7 となる。

⑯対数増殖期：対数曲線を描いて増殖している時期 (図 2)。この時期はワムシの活性が高い。

⑰環境抵抗：ワムシが本来持っている最高の増殖を抑制する環境要因。例えば餌料の不足・過多、水質の悪化、溶存酸素の低下、共存微生物の作用等、様々なものが総合的に作用して環境抵抗となる。

⑱定常状態<sup>12)</sup>：連続培養を数式化して考えるとワムシの比増殖率、h を収穫率とすると培養槽での密度変化  $dN/dt$  ( $N$ : 密度  $t$ : 日数) は

$$dN/dt = (r - h)N \quad \text{で表される。}$$

すなわち、収穫率 h が比増殖率 r に等しいとき培養槽内のワムシ密度は一定に保たれ、この状態を連続培養の定常状態と呼ぶ。

⑲安定状態：連続培養において培養槽内のワムシ密度が安定し、ほぼ一定値に推移している状態。

⑳非解離アンモニア<sup>13)</sup>：水質分析でアンモニア態窒素として測定されるものは、遊離のアンモニア ( $\text{NH}_3$ ) と、それが解離してイオン態になったアンモニウムイオン ( $\text{NH}_4^+$ ) の合計である。水中での解離は次の式で表され、両者の割合は淡水では pH と水温によって変化する。



両者のうち、毒性の強いものは遊離のアンモニアであり、イオンに分かれていない (解離していない) という意味で通常「非解離アンモニア」と呼ばれている。この非解離アンモニアは高 pH、高水温で多くなる。

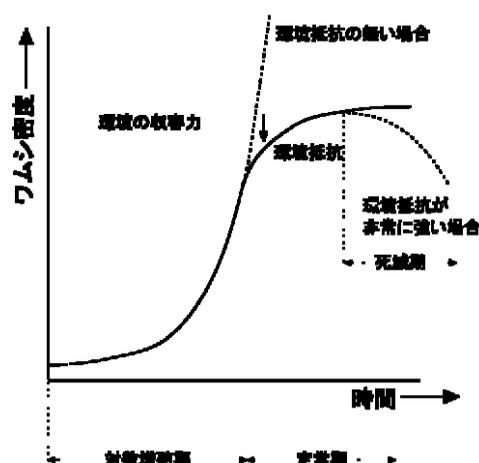


図 2 ワムシの増殖模式図

## 1 ツボワムシの生物学的特性

### 1.1 ツボワムシ

ツボワムシ *Brachionus calyciflorus* PALLAS は輪形動物門 (Rotifera) 単生殖巣綱 (Monogononta) に属する動物プランクトンで、全国の富栄養化した池沼に広く分布する普通種である。淡水域に生息するワムシとしては比較的大型種 (背甲長 250~550  $\mu\text{m}$ ) で、体は後半部が丸い透明な長円形で、前縁に4本のほぼ等長の刺状突起を有する。また、後縁にも後側方棘を有する場合もあるが、ほとんど認め得ないものもある<sup>14)</sup>。

### 1.2 生活史

ツボワムシの生活史は、その生殖形態から考慮して、シオミズツボワムシと近似していると考えられるので、シオミズツボワムシの生活史<sup>15)-17)</sup>を参考に図1-1に示し、説明する。

ツボワムシは、生活史の中に単性世代と両性世代をもち、雌には単性生殖を行う雌と両性生殖を行う雌がある。単性生殖雌は減数分裂を行うことなく核相  $2n$  の卵 (複相単性生殖卵) を形成し、個体群の増殖をもたらす。(シオミズツボワムシの場合、至適な条件下では1日に3~4個の卵を産むこともあり、2週間前後の一生では10~20個を産卵する。) 一方、両性生殖雌は、減数分裂によって核相  $n$  の卵を形成し、これが雄の交尾を受けなかった時や、交尾を受けても受精せずに発生すると、半数体の雄が生じる。耐久卵の形成は、両性生殖雌がまだ若い時期 (シオミズツボワムシの場合水温 25°C では8時間以内) に交尾を受け、受精すると核相  $2n$  の受精卵 (耐久卵) を形成する。若い時期までに交尾しなかった両性生殖雌は、以後交尾の有無に関わらず、受精していない卵に由来する雄ばかりを生じる。すなわち、両性生殖雌には、雄を作る個体と受精卵 (耐久卵) を作る個体が存在する。

餌料生物としての大量培養を考えると、両性生殖雌は、初期餌料としては小さすぎる雄を産出するか、ふ化までに時間を要する耐久卵を形成するかであり、増殖には寄与しない。一方、単性生殖雌は、次々と産卵し爆発的な増殖を示すため、大量培養を行

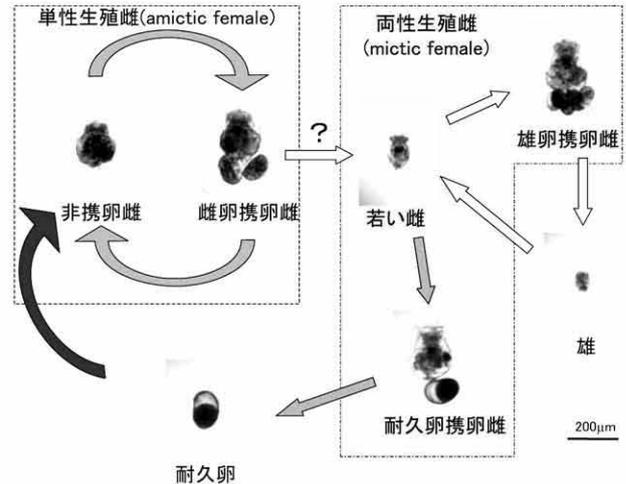


図1-1 ツボワムシの生活史

うには適している。そのため、なるべく両性生殖雌を産出しにくい株が望まれる。現在、海産魚類の種苗生産に用いられる海産ワムシ類では、両性生殖雌の出現が極めてまれな状態であり、耐久卵を全く産出しない株も報告されている<sup>18)</sup>。

一方、ツボワムシでは、まだ培養が始まって間もないこともあり、両性生殖雌、すなわち耐久卵の形成を行うサイクルの雌が出現しやすい。しかし、この特性を利用すれば、耐久卵で株の保存を行うことも比較的容易である。

一般的に耐久卵の形成は、水温や水質、餌料等の生息環境の悪化時に起こると考えられている。しかし、海産ワムシ類では、両性生殖雌が出現し耐久卵が形成されるのは、良好な環境で餌料も豊富な状態の時であることが萩原<sup>16)</sup>により総説で述べられている。ツボワムシにおいても両性生殖雌は、拡大培養初期のまだ新しい水で、餌料が余っている状態の時によく出現し、耐久卵を形成する。しかし、連続培養が安定状態になり、残餌がほとんどない状態になると、両性生殖雌の出現は極めて少なくなる。

### 1.3 滋養水試株の形態

#### 携帯卵の形状による雌の区別および雄

##### 非携卵雌

生体では繊毛冠を背甲の外に出し、遊泳する。時々、肢を出し、方向転換や器物に付着する。固定すると繊毛冠も肢も背甲内に隠れた状態となる (図 1-2)。ふ化後間もない個体は雌卵の大きさとはほぼ同じである。

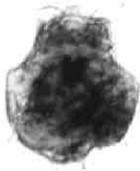


図 1-2 非携卵雌

##### 雌卵携卵雌

雌卵 (複相単性生殖卵) の形状は長球形で、背甲長の半分程度と大きく、全体が薄い色をしている。通常 1~2 個程度を携卵している (図 1-3)。



図 1-3 雌卵携卵雌

##### 耐久卵携卵雌

耐久卵 (受精卵) の形状はくびれた長球形で、雌卵と同じか若干大きく、濃褐色である。産卵後ある程度の時間を経ると卵の一端に空所を備える。1 個のみを携卵していることが多い (図 1-4)。



図 1-4 耐久卵携卵雌

##### 雄卵携卵雌

卵の形状は球形に近い長球形で、背甲長の 1/4 程度と小さい。1~10 個程度の多数を携卵している (図 1-5)。

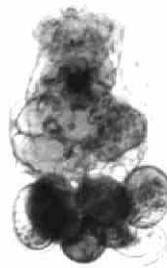


図 1-5 雄卵携卵雌

##### 雄

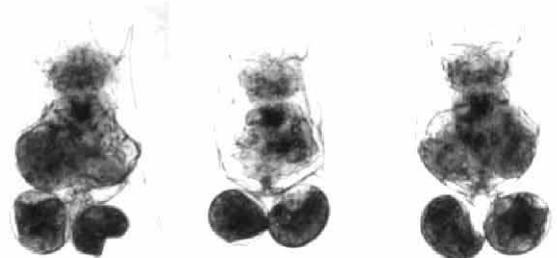
雄は小さく、雄卵とほぼ同じ大きさの 50 μm 程度で、直線的に素早く動き、雌の周りでは旋回する。固定すると長球形となり、赤い点が見える (図 1-6)。雄は消化器官もなく、体のほとんどが遊泳器官と生殖器官である。



図 1-6 雄

##### 形態の変異

ツボワムシは、連続培養を行った時に後側方棘の変異があり、棘が伸張するときと、ほとんど認められなくなる時がある (図 1-7)。後側方棘の変異は H 野<sup>20)</sup>により、*Asplanchna* (フクロワムシ属) の存在や両性生殖との関係が総説で述べられている。しかし、これまでの培養では、*Asplanchna* の存在がなくとも培養中に変異が度々起こる。連続培養の安定期には後側方棘の長い個体はあまり出現しないが、培養が不調になる直前や、培養が不調となった後、復調する時に一斉に現れることが多い。このことから、水質等の環境条件の変化がツボワムシに作用して形態的变化が起こるものと思われる。



後側方棘の長い個体 後側方棘の短い個体 後側方棘のない個体

図 1-7 ツボワムシの後側方棘の変異

大きさ

10L 槽拡大培養終了時の雌卵携卵雌の平均背甲長  
236.94 ± 15.60 μm (平均 ± 標準偏差)

1000L 槽連続培養時の雌卵携卵雌の平均背甲長  
207.38 ± 18.03 μm (平均 ± 標準偏差)

それぞれの雌卵携卵雌の背甲長組成を図 1-8 に示した。それぞれの背甲長の範囲は大きく変わらないが、連続培養時では小型個体の占める割合が大きい。これは、海産ワムシ類の装置連続培養<sup>10)</sup>と同様に、高い収穫率により若齢個体の占める割合が高くなるためであり、平均背甲長はやや小型になるが、時間が経過すれば成長するため、実質上問題はない。

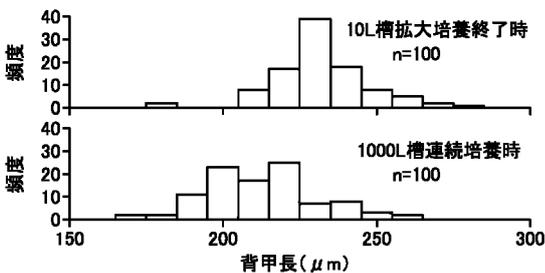


図 1-8 拡大培養終了時と連続培養時の雌卵携卵雌の背甲長組成

1.4 株

海産ワムシ類では増殖特性や大きさ等の異なる様々な株が存在するが、ツボワムシでは増殖特性の異なる 2 株を滋賀水試で保存している。一つは、施肥培養を行ってきた餌料培養池の底泥の耐久卵から分離した株（以後従来株とする）であり（分離方法については 2.2.2.1 「ツボワムシの分離」を参照）、もう一つは、連続培養時に出現した増殖特性に優れた滋賀水試株である。

従来株は、雄卵や耐久卵を携卵している両性生殖雌の出現率が高いため、耐久卵の作出が容易である。しかし、連続培養を行う場合には、両性生殖雌は増殖に寄与しないため、増殖率が低くなり高い収穫率は望めない。また、両性生殖雌は周期的に増加し、これらが増加した翌日にワムシ密度は減少するため、従来株は周期的に不安定な培養となる株である（2.2.4.2 連続培養事例「100L 槽連続培養」参照）。

一方、滋賀水試株の起源は、従来株を 10L 槽および 100L 槽で拡大培養後、1000L 槽連続培養（2.2.4.2

連続培養事例「1000L 槽連続培養事例-1」参照）を行ったところ、培養当初は、前述の 100L 槽連続培養と同様に両性生殖雌の出現率が高かったが、培養 20 日目頃から両性生殖雌の出現が減少したため、培養終了日の 64 日目に再び分離を行ったものである。分離以後、滋賀水試株は株の保存を繰り返しても、両性生殖雌の出現が比較的少ない株となった。

従来株と滋賀水試株の違い

従来株と滋賀水試株の違いを示すため、同時に 10L 水槽で拡大培養試験を行った。

**方法** 供試ツボワムシは、分離から 63 週日の従来株と分離から 35 週日の滋賀水試株を用いた。10L スチロール水槽を用い、塩素消毒後中和した水道水 9.6L を水温 25℃ に調整後、濃縮淡水クロレラ（クロレラ工業社製）を 4mL 添加した。そこに、それぞれの株保存瓶の培養水ごとツボワムシを接種し、培養水量 10L とした。2 日目から毎日 1 回、濃縮淡水クロレラを 4mL ずつ給餌した。試験は 2005 年 3 月 9 日～14 日の 5 日間の培養を行い、それぞれのワムシ密度を計数した。また、それぞれの一部を 5%ホルマリン液で固定し、雌卵携卵雌の背甲長を万能投影機を用いて測定した。

**結果** 株別の拡大培養試験結果を表 1-1 に示した。生産したツボワムシ個体数は、滋賀水試株では 178 万個体となり、従来株の 18 万個体の 9.9 倍、日間増殖率は同 1.9 倍となった。試験前後の株別の携卵形状別雌雄密度を表 1-2 に示した。それぞれの拡大培養後の、携卵雌個体数に対する単性生殖雌個体数と

表 1-1 10L 槽拡大培養による株の差試験結果

	滋賀水試株	従来株
接種個体数	6,000	4,400
培養個体数	1,780,000	180,000
培養日数	5	5
比増殖率	1.14	0.74
日間増殖率	212.2	110.1

比増殖率 = ln(培養個体数/接種個体数)/5日間  
 日間増殖率 = (exp比増殖率-1)\*100

表 1-2 株別携卵形状別ワムシ密度(個体数/mL)

	株保存瓶(400mL)中		10L 拡大培養終了後	
	滋賀水試株	従来株	滋賀水試株	従来株
非携卵雌	12	8	97	5
雌卵携卵雌	2	1	45	4
耐久卵携卵雌	1	1	18	9
雄卵携卵雌	1	1	18	0
雄	1	1	76	3
単性生殖雌比	50.0%	33.3%	55.6%	30.8%
両性生殖雌比	50.0%	66.7%	44.4%	69.2%

両性生殖雌個体数の比を比較すると、滋賀水試株では単性生殖雌比の方が高いが、従来株では両性生殖雌比の方が高く、これが増殖率の差になったものと考えられる。

また、拡大培養後の雌卵携卵雌の背甲長組成を図 1-9 に示した。それぞれの背甲長の範囲は、一部重なる部分もあるが異なった。平均背甲長は、滋賀水試株が 237  $\mu\text{m}$ 、従来株が 274  $\mu\text{m}$  となり、統計的に有意な差 ( $p < 0.001$ ) となった (表 1-3)。この試験ではワムシ密度に関係なくクロレラを等量与えたため、ワムシ 1 個体あたりの給餌量が異なったことで背甲長に差が生じた可能性はあるが、滋賀水試株は従来株に比べて小型化したと考えられる。なお、海産ワムシ類の場合、同株でも、塩分濃度や水温および餌料種類の違いによる大きさの変化は知られている<sup>21)22)</sup>。

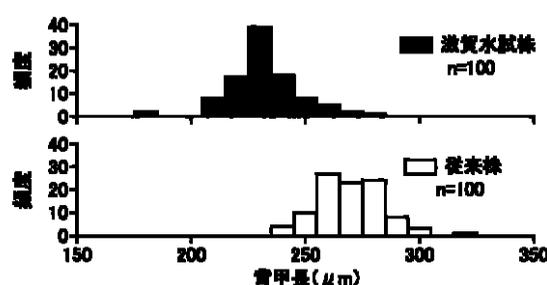


図 1-9 拡大培養後の株別雌卵携卵雌の背甲長組成

表 1-3 拡大培養後の株別の雌卵携卵雌の背甲長 ( $\mu\text{m}$ )

	滋賀水試株	従来株
平均	237	274
標準偏差	15.8	14.4
最大	285	321
最小	186	241
計測個体数	100	100
Student's <i>t</i> -test $t = -17.25$ $p < 0.001$		

### 1.5 滋賀水試株の水温別増殖特性

海産ワムシ類の最適培養水温は、いわゆるS型、L型ワムシでは異なり、また、同型でも株によって異なることが知られている<sup>23)</sup>。ワムシ類の培養は増殖率が最大となる水温で行うことが理想であり、それぞれの株ごとの水温特性を把握する必要がある。とりわけ、容易に調整可能な増殖促進のための培養環境要因として、海産ワムシ培養では海水の塩分濃度の調整 (海水の希釈)<sup>24)</sup>もあるが、淡水ワムシ培養では水温調整のみであるため、最適培養水温の把握は重要である。そこで、ツボワムシ滋賀水試株の水温別増殖特性を小磯<sup>25)</sup>に準じて調べた。

方法 供試ツボワムシは、滋賀水試株を 800L 槽改良間引き培養 (2.2.4.3 改良間引き培養事例「800L 槽改良間引き培養」と同形式) で連続培養中の良好な状態で増殖しているツボワムシを用いた。培養水は、ろ過滅菌地下水 (ミリポア AP (孔径 1  $\mu\text{m}$ ) でろ過後オートクレーブ処理 (121 $^{\circ}\text{C}$  15 分間) した地下水) に、濃縮淡水クロレラ (クロレラ工業社製) を添加し、558 万細胞/ml の密度に調整した。6 穴マイクロプレートの 1 穴に培養水を 5mL 入れ、そこに、ふ化直後のワムシ仔虫を 5 個体ずつ接種した。この操作を 6 穴に繰り返した後、乾燥を防ぐため、マイクロプレートとそのフタをビニールテープで目止めした。これを水温別に用意し、20、23、26、29 および 32 $^{\circ}\text{C}$  に設定した温度勾配恒温器 (NKSystem IG-100-AD) 内に設置した。なお、照明は 12 時間明、12 時間暗にした。餌料のクロレラの沈殿を防ぐため、試験開始翌日から、朝 (6 時頃) と夕 (18 時頃) にマイクロプレートシェーカー (IWAKI SHAKING MIXER SHM-200) で 5 分間撹拌した。試験は 2004 年 12 月 21 日~24 日の 3 日間の培養を行い、それぞれのワムシ密度を計数した。なお、小磯<sup>25)</sup>の海産ワムシ類の水温別増殖特性の把握試験では、マイクロプレートの 1 穴に接種するワムシ数は 10 個体で試験期間を 4 日間としているが、予備試験の結果、ツボワムシでは高水温区で試験終了時に餌料不足と考えられたので、接種個体数 5 個体、試験期間 3 日間とした。

結果 水温別の携卵形状別雌雄個体数、形状別卵数および死亡個体数の平均値を表 1-4 に示した。水温 20~32 $^{\circ}\text{C}$  の範囲では、水温が高いほど増殖したツボワムシの個体数は多かったが、死亡個体数も多くなった。また、耐久卵が 29 $^{\circ}\text{C}$  区、32 $^{\circ}\text{C}$  区で見られ、

表 1-4 滋質水試株の水溫別増殖特性試験結果

	20℃区	23℃区	26℃区	29℃区	32℃区
平均計数値					
非携卵雌	62	134	200	240	245
雌卵携卵雌	31	41	19	9	11
耐久卵携卵雌	0	0	0	2	3
雄卵携卵雌	3	3	14	6	6
雄	3	5	26	25	22
雌卵	49	42	19	11	15
耐久卵	0	0	0	3	9
死亡個体	2	3	9	23	36
全雌個体数	95	178	233	257	265
比増殖率	0.98	1.19	1.28	1.31	1.32
日間増殖率(%)	167.2	229.2	259.6	271.6	275.8

比増殖率 =  $\ln(\text{全雌個体数}/5\text{個体})/3\text{日間}$

日間増殖率 =  $(\exp\text{比増殖率}-1)*100$

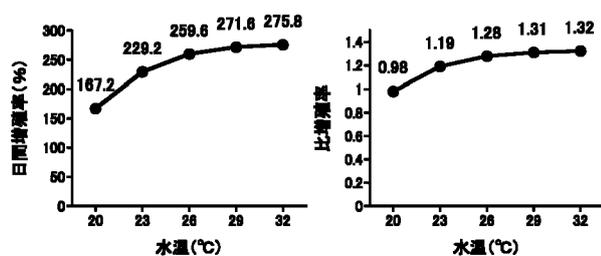


図 1-10 滋質水試株の水溫別日間増殖率および比増殖率

32℃区では全ての穴に見られた。水溫別日間増殖率および比増殖率を図 1-10 に示した。水溫 20～32℃の範囲では、水溫が高いほどそれぞれの値は高くなったが、水溫 26℃以上では、それ以下に比べると差は小さかった。これらのことから、加温のコストも考慮に入れて、培養水溫は 26℃程度が良いと考えられた。また、株の保存のため耐久卵を形成させるには、30℃程度の高水溫が良いと考えられた。

## 2 淡水ワムシの大量培養

### 2.1 これまでの淡水ワムシの培養方法（施肥培養）

これまでの淡水ワムシの培養方法である施肥培養では、なるべく広い池（100m<sup>2</sup>以上）を用いることが望ましい。滋賀水試では、主に100m<sup>2</sup>、200m<sup>2</sup>、600m<sup>2</sup>の水深1mのコンクリート製野外池を餌料培養池として使用している。肥料の種類や量は様々なものを用いられているが、滋賀水試では経験的に、池面積1㎡あたり石灰0.125kg、池水量1kLあたり鶏糞0.6kg、醤油かす0.3kgを用いている。方法は、4月頃であれば、ワムシが必要となる20～25日前頃に、浅く水を入れた池に前記の分量の石灰を散布し、トンボ等で十分に攪拌して消毒を行う。次に前記の分量の鶏糞、醤油かすを散布し、注水後、再び十分に攪拌する。これ以後、エアレーションによる攪拌を継続し、併せて最初の数日間池に入ってトンボ等で攪拌する。通常はワムシの接種は行わないが、培養池が新しい場合には、前年に良好な培養ができた餌料培養池の泥や、水田の土等を入れると泥中の耐久卵が接種される。水の色は初めは茶色であるが、植物プランクトンが増殖して次第に緑色へと変わり、さらに、緑色から透明な茶色に変わる。その頃からワムシが確認され始め、その後、1週間ほどでワムシが多数発生する。収穫は、目合いが90μm程度のネットで作製した吹き流し状の収穫ネットを、池の周囲から曳くことにより行う（図2-1）。あるいは、水中ポンプを用いて、池に設置した収穫ネットに流し入れて行う。

2002年に100m<sup>2</sup>（水量100kL）の池を用いて行った施肥培養の事例を図2-2に示した。毎朝、培養池の日間最高最低水温を記録し、同時に採水し、1mL中のワムシを計数した。事例1では、4月21日に施肥を行ったところ、17日目よりワムシが確認され、

24～29日目にワムシが20個体/mL以上発生した。初期にはツボワムシが、後期にはアカツボワムシ *Brachionus rubens*が多く発生した。事例2では、4月26日に施肥を行ったところ、15日目からワムシが確認され、19～26日目にワムシが20個体/mL以上発生した。この事例では、初期からアカツボワムシが多く発生した。事例3では、5月1日に施肥を行ったところ、21日目からワムシが確認されたが、その後、10個体/mLにも増加せず、培養期間が終了した。事例4では、5月8日に施肥を行ったが、培養終了の23日目になってもワムシの発生は確認できなかった。

ワムシの発生が見られた事例1、2、3では途中何度かワムシの収穫を行っているので、ワムシが減少したと考えられるが、通常、収穫しなくても概ね1週間ほどでワムシは減少する。ワムシの減少後はタマミジンコ *Moina macrocopa* やミジンコ類 *Daphnia* sp. の発生へと移行し、ワムシは発生しても数個体/mL程度にしかならない。このワムシの減少は、発生前のグリーンウォーターが大量発生後には茶褐色透明な水となることから、主に餌料不足によるものと考えられ、その後の低密度はミジンコ類との競合によるものと考えられる。このように、ワムシが収穫できる密度で発生している期間は短いため、ワムシを数週間にわたって種苗生産の仔魚に与える場合には、施肥日を少しずつずらして何面もの池で培養する必要がある。また、発生するワムシ密度は、最大でも50個体/mL程度であり、大量生産には大きな培養池が必要となる。発生するワムシは、ツボワムシとアカツボワムシが多いが、コガタツボワムシ *Brachionus angularis* やハネウデワムシ *Polyarthra vulgaris* 等の他のワムシも発生し、この培養方法ではワムシの種類を選べない。まれにフクロワムシ *Asplanchna priodonta* が発生することがあり、これ



図2-1 施肥培養の収穫風景

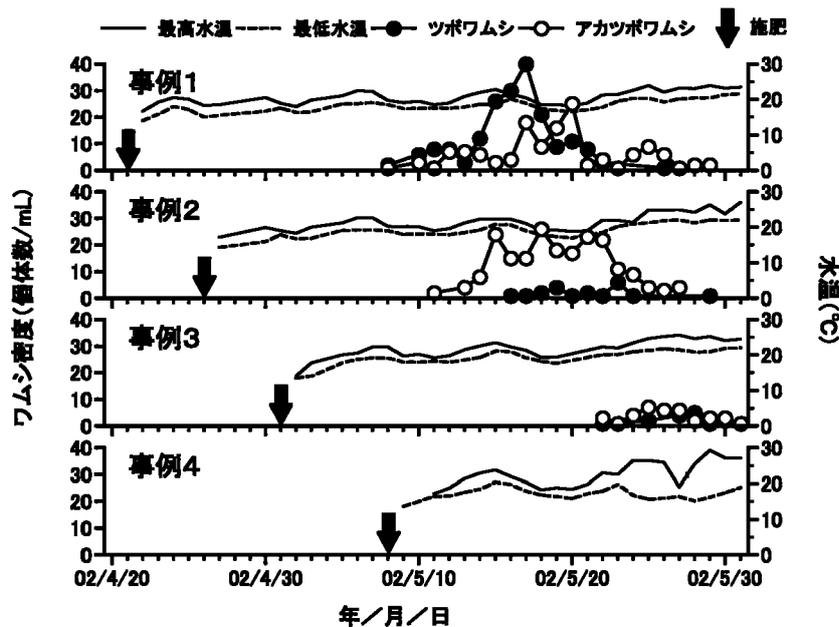


図 2-2 100 m<sup>3</sup> (水量 100kL) コンクリート池での施肥培養

が発生すると、ツボワムシ等は捕食され、急激に減少する。なお、フクロワムシは大型(体長 600～1400  $\mu\text{m}^{\text{D}}$ )であるため、初期餌料としては適さない。

種苗生産の成績は、初期餌料の確保に左右される。すなわち、魚のふ化に合わせていかにタイミング良くワムシを発生させられるかが重要な鍵となる。しかし、施肥培養は広大な露地池での培養であるため、水温管理は困難で水温は外気温に影響され、また、ワムシの餌料である植物プランクトンの発生は日射に影響される。これらのことは、培養時期(季節)と天候によりワムシの発生の時期や量が大きく左右されることを意味し、このため、魚のふ化とワムシの発生のタイミングを合わせることは困難である。また、培養池の形状(特に水深)によっても発生状況は異なることや、立地場所の影響と思われるが培養池ごとにクセのようなものがあるため、おおよその発生時期を把握するだけでも数年の経験を要する。前述の施肥時期「ワムシが必要となる 20～25 日前頃」は、「4 月頃」で、「滋賀水試の培養池」であるという条件で有効であり、これはこれまでの経験から導き出された結果である。この時期で平年並みの気象条件であれば、フナ類やホンモロコ等のふ化とワムシの発生のタイミングを、概ね合わせることができる。しかし、現在、滋賀水試で種苗生産に取り組んでいるワタカは、水温が上昇する 6、7

月頃が産卵期であり、この時期の施肥培養は、施肥から約 1 週間でワムシが発生し、その後、約 3 日で発生は終了するため、ワムシの長期にわたる安定確保は困難である。

一方、この培養の利点は安価であることと、簡易であり特別な知識を要しないことが挙げられる。また、フナ類やワタカのように比較的富栄養な水質に耐えられる魚種の場合は、「水作り」として種苗生産池の施肥を行い、ワムシが発生した時点で収容を行えば、初期餌料が飼育水中に存在し、続いて発生するミジンコ類が稚魚の餌料となるため、良好な餌料環境となる。種苗の収容密度が低く、動物プランクトンが良好に発生すれば、種苗生産初期の給餌の必要がない場合もある。

農業系無機質肥料を使用する事例は、伊藤<sup>23)</sup>、徳島県水産試験場<sup>4)</sup>の報告に記載されている。すなわち、各種肥料を施肥後、クラミドモナス等の植物プランクトンを接種する。植物プランクトンの増殖後、ツボワムシを接種し、ツボワムシ培養を行う事例が報告されている。この場合も屋外培養であるため、接種した植物プランクトン以外の種類の増殖や、繊毛虫の大発生が起きることがあり、時にはフクロワムシが混入し、ツボワムシが激減する<sup>24)</sup>ことがある。なお、滋賀水試ではこの方法によるツボワムシ培養は行っていない。

## 2.2 新しい培養方法 (連続培養)

### 2.2.1 培養工程

株保存から連続培養にいたる培養工程の概略を図2-3に示す。

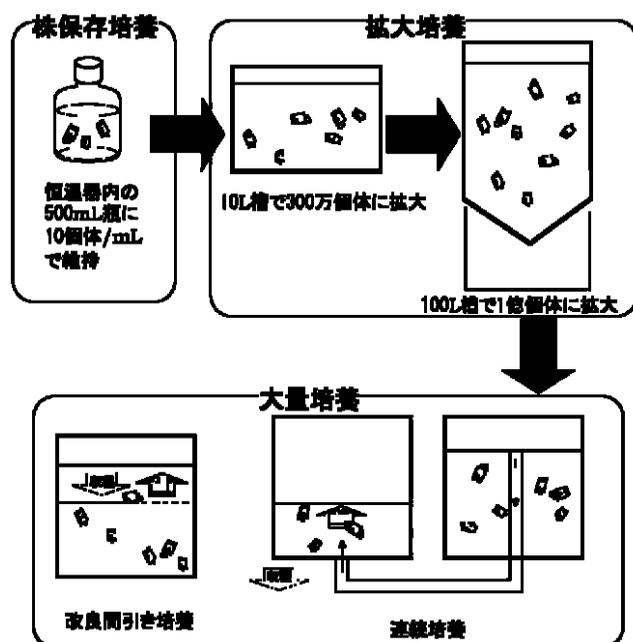


図2-3 大量培養までの工程概略

株保存培養は、500ml. 瓶を用いて、1週間間隔の植え継ぎ培養により、約10個体/mL程度の低密度で株を維持している。これを継続することにより、周年の大量培養が可能である。

拡大培養は、10L槽および100L槽培養の2段階で行う。始めに、株保存瓶中の約5,000個体を、10L槽を用いて5日間の培養で約300万個体に増殖させる。次に、100Lアルテミアふ化槽を用いて、ケモスタット式給餌管理<sup>(4)(5)</sup>により、5日間で約1億個体に増殖させる。

大量培養は、ツボワムシを仔稚魚の餌料とするための生産である。培養槽と収穫槽の2槽を用いて運転する連続培養法と、1槽のみで運転する改良間引き培養法の2種類がある。どちらも長期間にわたって、同一水槽で毎日の収穫を行うことができる。培養管理は連続注水、連続給餌、ケモスタット<sup>(4)(5)</sup>を基本とする。

## 2.2.2 大量培養のための準備と管理方法

### 2.2.2.1 ツボワムシの分離方法

- ①30L. パンライト水槽に地下水を20L入れ、水温を25℃に設定後、クロレラを8mL添加する。
- ②従来から施肥培養を行ってきた餌料培養池の底泥を一握り程①に入れ、エアレーションをする。
- ③約1週間後、ワムシ類等のプランクトンが底泥中の耐久卵からふ化するので、これをピペットでシャーレに採る。
- ④ろ過滅菌地下水(ミリポアAP(孔径1μm)でろ過後、オートクレーブ処理(121℃ 15分間)した地下水)、10穴ホールスライドガラス、マイクロピペット、6穴マイクロプレートを用意する。
- ⑤10穴ホールスライドガラスの各穴に、ろ過滅菌地下水を数滴ずつ入れ、③からツボワムシ(雌卵携卵雌)を、実体顕微鏡下で1個体取り出し、1穴に入れる。
- ⑥しばらくおいた後、再びツボワムシを取り出し、となりの穴に入れる。この操作を10回程度行いツボワムシを洗浄する。
- ⑦実体顕微鏡下で検鏡し、原生動物等の他生物の混入がないかを確認する。混入があれば⑤の操作に戻る。
- ⑧6穴マイクロプレートにろ過滅菌地下水を5mL入れ、クラミドモナス(2.2.2.3 ツボワムシ培養の餌料種類「クラミドモナス」参照)を0.5mL(約1万細胞)添加した後、⑦のツボワムシを1穴に1個体ずつ入れる。これを室温20℃程度の恒温室に置く。
- ⑨ろ過地下水を入れた100mL三角フラスコを6本用意し、オートクレーブ処理により滅菌後、恒温室に置き、水温を調整する。
- ⑩4日後、⑧のマイクロプレートの最も増殖の良い穴から雌卵携卵雌を1個体採り、⑥の洗浄操作後、クラミドモナスを10mL(約25万細胞)添加した⑨のフラスコに入れる。この操作を6個体分行う。
- ⑪ろ過地下水を入れた500mLのねじ口瓶をオートクレーブ処理により滅菌後、恒温室に置き、水温を調整する。
- ⑫7日後、⑩のフラスコのツボワムシを計数し、最も増殖し、かつ両性生殖雌の少ないフラスコ

から雌卵携卵雌を 20 個体採り、⑥の洗浄操作後、クラミドモナスを 40mL (約 100 万細胞) 添加した⑩に入れる。

なお、以上の分離操作はクリーンベンチ内で行うことが望ましい。

滋賀水試で保存している従来株は①～⑧の操作により分離し、2003 年 12 月 21 日に 3 個体産出された非携卵雌を⑩の培養瓶に入れ、増殖させ、継代培養したものである。また、滋賀水試株は 1000L 槽連続培養 (2.2.5.2 連続培養事例「1000L 槽連続培養事例-1」参照) から 2004 年 7 月 1 日に数個体採取し、④～⑫の操作により再び分離を行ったものである。

### 2.2.2.2 株の保存方法

- ①ろ過地下水(ミリポア AP(孔径 1 $\mu$ m)でろ過した地下水)を 400mL 入れた 500mL のねじ口瓶を、オートクレーブ処理 (121 $^{\circ}$ C 15 分間) により滅菌後、恒温室に置き、水温を調整する。
- ②株保存している培養瓶より直接、培養水ごとツボワムシを 100mL (約 1,000 個体) 接種する。
- ③培養したクラミドモナス (2.2.2.3 ツボワムシ培養の餌料種類「クラミドモナス」参照) を 40mL (約 100 万細胞) 給餌する。
- ④フタをしっかりと閉め、20 $^{\circ}$ C に設定した人工気象器内に入れる。なお、人工気象器の照明は 12 時間明、12 時間暗にする。

なお、以上の操作はクリーンベンチ内で行うことが望ましい。



図 2-4 株保存培養

上段：餌料用クラミドモナス培養

下段：ツボワムシ株保存培養

滋賀水試では植え継ぎ間隔は 1 週間で、約 10 個体/mL 程度 (500mL 中に約 5,000 個体) の低密度でツボワムシを維持している (図 2-4)。

### 2.2.2.3 ツボワムシ培養の餌料種類

クラミドモナス (*Chlamydomonas* sp. 図 2-5)

クラミドモナスはツボワムシの分離や株の保存用の餌料として用いる。

クラミドモナスは単細胞性の緑藻で、20 $\mu$ m 前後の球形の細胞に鞭毛を有し、遊泳するため浮遊性に優



図 2-5 クラミドモナス

れている。このため、通気や振とう等の攪拌の必要がなく、管理が平易で、原生動物等の混入防止のためワムシ培養瓶を密閉することができる。滋賀水試で用いているクラミドモナスは、2002 年 5 月に琵琶湖から分離した株である。クラミドモナスの培地は C 培地 (成分は表 2-1<sup>26)</sup> のとおり) を用いている。

表 2-1 C 培地の組成

Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	15 mg
KNO <sub>3</sub>	10 mg
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	4 mg
$\beta$ -グリセロリン酸ナトリウム	5 mg
ビタミンB1	1 $\mu$ g
ビタミンB12	0.01 $\mu$ g
ビオチン	0.01 $\mu$ g
トリス緩衝剤	50 mg
PIV金属混液	0.3 mL
蒸留水	99.7 mL
pH 7.5	
PIV金属混液	
FeCl <sub>3</sub> ·6H <sub>2</sub> O	19.6 mg
MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	3.6 mg
ZnCl <sub>2</sub>	1.05 mg
CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0.4 mg
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.25 mg
Na <sub>2</sub> EDTA·2H <sub>2</sub> O	100 mg
蒸留水	100 ml

クラミドモナスの株保存培養および餌料用培養方法

- ①株保存培養用として、ねじ口試験管に培地を 10mL 入れたものを 3 本、餌料用培養用として、300mL 三角フラスコに培地を 100mL 入れたものを 3 本用意し、オートクレーブ処理 (121 $^{\circ}$ C 15 分間) により滅菌する。
- ②株保存している試験管 1 本から 1mL ずつを、①で用意した試験管 3 本に接種する。
- ③株保存している他の試験管 2 本と②の残りを、①の三角フラスコにそれぞれ接種する。
- ④フタを軽く閉め、20 $^{\circ}$ C に設定した人工気象器内に入れる。なお、人工気象器の照明は 12 時間明、12 時間暗にする。

なお、以上の操作はクリーンベンチ内で行い、試

試験管およびフラスコの口は火炎滅菌を行う。

滋賀水試では、植え継ぎ間隔は1週間で、株保存用試験管中の密度を約 3,000 細胞/mL 程度で維持している。また、餌料用培養は約 25,000 細胞/mL 程度で培養している。

### 淡水クロレラ (図 2-6)

拡大培養および連続培養時の餌料として、市販の濃縮淡水クロレラを使用する。濃縮淡水クロレラは、数社から海産ワムシ類等の培養用にビタミンB<sub>12</sub>を含有させ、工業的に生産し、市販されている。滋賀水試ではクロレラ工業株式会

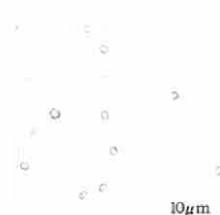


図 2-6 クロレラ



図 2-7 クロレラ製品

社製「生クロレラ-V12」(図 2-7 公称密度 110~130 億細胞/mL)の使用実績がある(以後この製品をクロレラと称す)。

### イースト (パン酵母 図 2-8)

イースト単独で用いた事例はないが、連続培養時に、水に溶解後(図 2-9)、クロレラと混合して併用給餌を行った事例はある。クロレラと比較すると安価であるため、餌料費の節減に有効である。また、冷凍保存も可能である。しかし、イーストは過剰給餌となった時に、繊毛虫の大増殖や水質悪化を招きやすい。滋賀水試では日清マリンテック株式会社製「海洋酵母 三共・イーストM」(図 2-10)の使用実績がある(以後この製品をイーストと称す)。

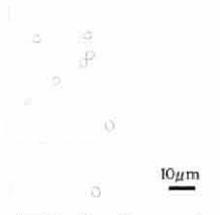


図 2-8 イースト



図 2-9 ミキサーによるイーストの溶解作業



図 2-10 イースト製品

イースト単独ではワムシへの栄養面で欠陥があり、植物プランクトン餌料と併用、または培養槽内のビタミンB<sub>12</sub>

産生菌に代表される細菌による栄養素の補給によって餌料として有効であることが知られている<sup>27)</sup>。

### 2.2.2.4 計数法

#### ツボワムシ個体数密度 (ワムシ密度) の計数法

- ①ツボワムシ培養槽からビーカー等の容器でサンプルを採取する。
- ②サンプルをさじでよく攪拌し、1mLマイクロピペットで時計皿に 1mLずつ入れる。計数の誤差を少なくするため、ピペットチップの口径は 2mm程度に切り、ピペットでの吸引は3秒程度かけて行う<sup>28)</sup>。
- ③10 倍程度の実体顕微鏡下で、生体のツボワムシの活性および状態を観察する。
- ④2%程度に調整したイソジン液を、時計皿ごとに1滴ずつ垂らし、ツボワムシを固定する。ツボワムシはイソジン液に触れると繊毛冠が収縮し、背甲内に隠れた状態で死亡する。この時、ツボワムシは時計皿の表面に肢で付着する場合がありますので軽く振ると良い。固定にはルゴール液やホルマリンを用いることが一般的であるが、イソジン液でもツボワムシは死亡するため、速やかに計数すれば問題はない。ただし、長く放置すると収縮した繊毛冠が伸び、固定する前に生きていた個体と既に死亡していた個体との区別がつきにくくなるので注意する。
- ⑤実体顕微鏡下でツボワムシを計数する。時計皿を細かく振ると、ツボワムシが並ぶので数えやすい(図 2-11)。計数は3皿以上で行い、非携卵雌、雌卵携卵雌、耐久卵携卵雌、雄卵携卵雌、雄、死亡個体(繊毛冠が収縮せずに背甲外に出ているもの)などに分けて行う。
- ⑥ワムシ密度が300 個体/mL以上の時は、100~200 個体程度計数できるよう、②の前に適当倍に希釈する。

計数時には、雌卵の数や大きさ、雌個体のサイズ

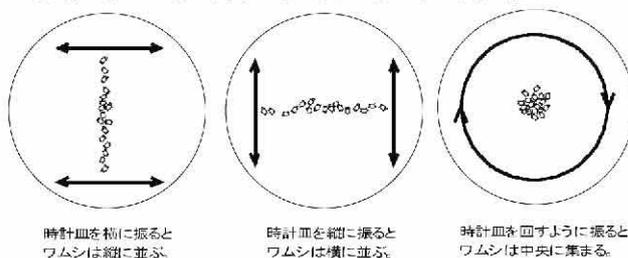


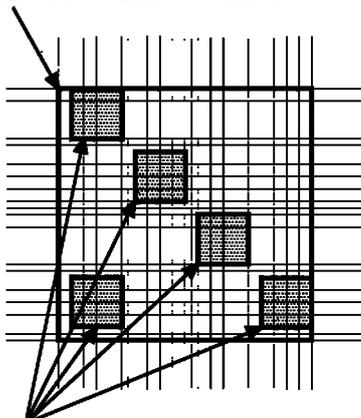
図 2-11 時計皿の振り方

組成、形態（後側方棘の変異）、複数携卵雌の出現状況、脱落卵の量、遊泳状態、摂餌状態、原生動物の種類や量等を観察すると培養状況の指標となる。

### 残餌密度の計数法

- ①血球計数盤 (Thoma) と専用のカバーガラスを、エタノールをつけた紙ワイパーで拭き、血球計数盤の左右の盛り上がり部分とカバーガラスをニュートンリングが現れるまで圧着する。ニュートンリングとは、ガラス面を密着させた時にできる光の干渉による縞模様である。これが現れると、薄く圧着できていることを示し、中央の盛り上がり部分とカバーガラスとの隙間は0.1mmとなる。ニュートンリングはカバーガラスを押さえながら血球計数盤に擦り合わせるようにすると現れやすい。
- ②血球計数盤の中央の盛り上がり部分とカバーガラスの隙間に、パスツールピペットで培養水のサンプルを全体に広がる程度挿入する。入れすぎて血球計数盤の溝を越えて左右の盛り上がり部分まで達すると、ニュートンリングが消え、隙間の厚みが変わってしまうのでやり直さなければならない。
- ③しばらく静置してクロレラを沈下させた後、200倍程度の顕微鏡下で計数する。隙間の液量はわずかであり、長く放置すると乾燥により密度が変わるので、速やかに計数を行わなければならない。計数するクロレラは円形のを数える。

残餌量が少ないときは —— 線枠内の400マスを計数する。



残餌量が多いときは —— 線枠内の16マスを斜めに4回と別の角の16マスの計80マスを計数し、5倍する。  
1mLあたりの残餌量 = 計数値 × 1万細胞/mL

図 2-12 血球計数盤の数え方

円形が欠けてかけらのようになったものは、ワムシが捕食後、排出したものであり計数しない。図 2-12 に示したとおり、計数盤の中央には1mm<sup>2</sup>を400のマサ目で刻まれており、クロレラの数が少ない（概ね200細胞以下）ときは、400マスのクロレラを全て数える。それ以上に数が多いときには、16マスを斜めに4回と別の角の16マスの計80マスを数え5倍する。この計数値×10,000細胞が1mLあたりの残餌量となる。なお、線上にあるクロレラの扱いは、例えば、上と右の線上を数えたときには、下と左の線上は数えないというように、対面するどちらかの線上のみを計数する。

計数盤の隙間には、雌ワムシが入り込むことはあまりないが、入り込むと繊毛冠の動きでクロレラが流れるので数えられない。この時はやり直さなければならない。雄ワムシが多い時や繊毛虫等が混入している時には、これらは小さいため隙間に入り込み、計数がやりづらくなる。しかし、これらを除きできないことと、沈下したクロレラを激しく流すほど動かさないで、このまま計数する。

### 2.2.2.5 水槽と用水の塩素消毒<sup>29)</sup>

拡大培養および連続培養を行う24時間以上前に、次亜塩素酸ナトリウム溶液（有効塩素濃度100ppm以上）で、水槽や配管、ヒーター、サーモスタット、微細通気管、懸濁物除去フィルター等の培養器具一式および収穫に用いるバケツや収穫ネット等、ワムシ培養に関する道具類全てを消毒する。中和は、投入塩素量と等量のチオ硫酸ナトリウムを水に溶解して行う。例えば、1,000L槽の消毒を行うには用水を満たした水槽に1Lの12%次亜塩素酸ナトリウム溶液を添加し（有効塩素濃度120ppm）、1日以上静置した後、120gのチオ硫酸ナトリウムで中和する。中和の確認は残留塩素測定用のパックテストや試験紙等の簡易な方法により行い、中和が完了するまでチオ硫酸ナトリウムを適量加えることを繰り返す。通常は水を入れ替えずに、この消毒した水で培養を開始する。塩素が少しでも残っていると培養に影響があるので、用水を入れ替えても良い。なお、チオ硫酸ナトリウムを少々過剰に添加しても、ツボワムシの培養には影響はないようであるが、許容量は不明なので確認を行いながら中和することを勧める。

## 2.2.3 拡大培養

ツボワムシの拡大培養は(独)水産総合研究センター能登島栽培漁業センターで実施している拡大培養を参考にした。拡大培養は10L水槽と100Lアルテミアふ化槽を用いて2段階で行う。

### 2.2.3.1 10L 槽拡大培養

#### 方法

- ①10L スチロール水槽にサーモスタット・ヒーター、エアストーンを設置し、水道水を9.5L入れ、ポリ袋でフタをする。水温は培養する温度に設定する（通常26℃）。
- ②24時間以上の塩素消毒（2.2.2.5「水槽と用水の塩素消毒」参照）を行う。中和確認後、クロレラを4mL添加する。この分量で水量10Lでは約500万細胞/mLのクロレラ密度となる。
- ③株保存培養瓶1瓶分（約5,000個体）を培養水ごと（0.5L）接種する。
- ④通常、接種後1日目は培養水が濁った緑色をしており、あまりクロレラは減っていないので給餌しない。培養水が緑色透明となった場合には、クロレラが減っているため4mL給餌する。
- ⑤2日目以後は毎日クロレラを4mL給餌する。この時、給餌を怠りツボワムシを飢餓状態にすると、後々の培養にまで影響するので注意を要する。
- ⑥5日目にツボワムシを計数する。通常、ワムシ密度は200~300個体/mLに増殖している。従って、10Lで200~300万個体生産されたことになる。これを、次の100L槽拡大培養の元種とする。
- ⑦拡大培養後は器具をよく洗浄し、水槽および器具の塩素消毒を行う。

なお、この10L槽拡大培養は万一の不調な場合に備えて、2槽で行うことが望ましい。

### 2.2.3.2 100L 槽ケモスタット式拡大培養

#### 方法

- ①100Lアルテミアふ化槽にサーモスタット、ヒーター、微細通気管（ユニホース FAL5000）、懸濁物除去フィルター（サランロック OM-150-25）を設置し、用水（通常水道水）を満水にして、ポリ袋でフタをする。水温は培養する温度に設定する（通常26℃）。

②24時間以上の塩素消毒（2.2.2.5「水槽と用水の塩素消毒」参照）を行う。中和確認後、10L槽拡大培養から培養水ごと接種するため、水量を90Lに調節し、クロレラを40mL添加する。この分量で水量100Lでは約500万細胞/mLのクロレラ密度となる。

③ツボワムシの接種は10L槽拡大培養から1槽分を培養水ごと入れる。10L槽拡大培養から約200~300万個体程度を接種するため、100Lでは20~30個体/mLの接種密度となる。

④培養経過の観察は毎日一定時に行う。水温、溶存酸素量、pHの測定およびワムシ密度、残餌密度を計数（2.2.2.4「計数方法」参照）する。

⑤給餌は、翌日（1日目）からクロレラをケモスタット式給餌管理<sup>(用器④)</sup>により行う。例えば、100%増殖（2倍の密度）を期待する場合は、前日の給餌量の倍量を与える。ただし、このケモスタット式拡大培養で特に注意する点は、培養水中の残餌密度で、これが150万細胞/mL以上であれば表2-2のように調整する必要がある。

表 2-2 給餌量の調整例

残餌密度の計数値	給餌量(前日比)
150万細胞/mL以下	×2
150~250万細胞/mL	×1
250~500万細胞/mL	×0.5
500万細胞/mL以上	中断*

\*給餌を半日程度中断し、残餌密度が150万細胞/mL以下になれば、前日の半量程度給餌する。(半日後に残餌密度が減らない時は、培養不調に陥っている可能性が高い。培養をやり直すべきである。)

なお、給餌は、餌料容器にクロレラと水を加えて一定量にし（合計で1L等）、マイクロチューブポンプにより24時間で全て滴下するよう、定量連続給餌を行う。給餌容器はクロレラの品質保持のため保冷し、クロレラの沈殿防止のため、エアレーションで攪拌を行う。

⑥1週間以上同じ水で拡大培養を行うと、水質が悪化するため、5日目程度で拡大培養を終了する。拡大培養が順調に推移すると、ワムシ密度は約1,000個体/mLに増殖している。従って約1億個体が生産されたことになる。これを大量培養の元種として用いる。収穫は目合いが50μm

程度のネットに流し入れて行う。あるいは、極力ツボワムシの損傷を防ぐため、培養水ごと収穫し、大量培養に接種してもよい。

⑦拡大培養後は器具をよく洗浄し、水槽および器具の塩素消毒を行っておく。

なお、この 100L 槽拡大培養は万一の不調に備えて、2 槽で行うことが望ましい。

## 2.2.4 連続培養

### 2.2.4.1 連続培養の考え方

ワムシの連続培養とは<sup>12)</sup>

- ・培養槽に連続的に用水を流入させ、流入させた分の培養水を連続的にワムシごと抜き取ることで増殖分の希釈と収穫を行う培養方法
- ・一種の流水式飼育であり、用水が連続的に新しい水に入れ替わるため、微生物相へのインパクトが少ないのみならず、環境抵抗<sup>(用語⑧)</sup>の蓄積速度よりも収穫率（培養槽を通過、すなわち希釈する割合）が高ければ、水質が悪化しない。
- ・培養槽内の環境が良好に保たれるため、空気通気でも高密度での長期培養が可能になり、かつ対数増殖期<sup>(用語⑨)</sup>が維持され、活性の高い高品質なワムシが生産される。

海産ワムシ類の連続培養では当初、タービドスタート<sup>(用語⑩)</sup>で研究が行われたが、後にケモスタート<sup>(用語⑪)</sup>により高密度長期培養が完成された<sup>9)</sup>。

ワムシ培養でのタービドスタート<sup>12)</sup>

- ・ワムシの増殖率を最高値に導くため、飽食レベルの給餌を行う。
- ・過不足なく飽食レベルの給餌を行うためには、収穫率を微調整してワムシ密度を一定に保つ必要がある。
- ・現状では、ワムシ密度を自動計測する方法がないため、リアルタイムで注水・収穫ポンプを自動制御できず、収穫率の微調整ができない。
- ・人手によるワムシ計数とポンプ調整では、ワムシ密度の変化が増殖率に影響し、これが更なる密度の変化を助長する悪循環に陥る。
- ・この結果、増殖率が収穫率より大幅に低くなり、ワムシ密度が直ちに減少するウォッシュアウト (wash out) 現象が起こりやすい。
- ・高い給餌率に由来する有機物負荷が、環境抵抗を増加させ水質環境を維持し難い。

ワムシ培養でのケモスタート<sup>12)</sup>

- ・給餌量は飽食レベル以下の一定値に固定し、また収穫率（希釈率）も固定する。
- ・ワムシ密度が上昇した場合には、個体あたりの摂餌量が少なくなって増殖率が低下し、ワムシが減少する結果、再び個体当たりの摂餌量が回復し、増殖率の上昇と共にワムシ密度も回復す

るといふネガティブフィードバック (negative feedback) 作用が働く。

- ・このワムシ自体の自律的な調節能力により、培養槽内のワムシ密度が調整され、ほとんど一定に推移する。
- ・給餌量が少ない事によって環境抵抗が小さくなるため、水質環境が維持され、長期の安定培養が可能になる。
- ・管理が極めて容易で、簡易な装置により自動化が可能。

ツボワムシの連続培養では海産ワムシ類の連続培養を応用したことから、連続給餌、連続注水、ケモスタットによる培養管理である。

狭義では、連続培養は「連続」して注水と収穫を行う方法であり、間引き培養はそれらが連続的ではないため、これに含まれないと解釈される。しかし、このマニュアルでは上記の培養管理を行うため、培養槽と収穫槽の2槽を用いて運転するものを「連続培養」、培養槽のみの1槽で運転するものを「改良間引き培養」と称し、どちらも連続培養の方式として扱うこととする。

## 2.2.4.2 基本構成および管理方法

### 連続培養

連続培養は、培養槽と収穫槽の2槽を用いて運転する方式である。連続培養の概念を図2-13に示す。

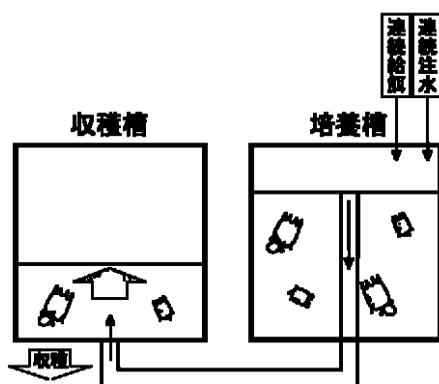


図2-13 連続培養の概念図

装置の基本構成は、管で連結された培養槽と収穫槽、注水装置、給餌装置、通気装置、水温調節装置、懸濁物除去フィルター、フタからなる。

連続培養の運転は、培養槽に連続注水および連続給餌を行い、オーバーフロー分を管で連結された収

穫槽に貯め、24時間で貯まった分を収穫する。培養管理はケモスタットで行う。

この方式の収穫水量、収穫率、収穫数、比増殖率、日間増殖率は以下の式により求めた。

$$\text{収穫水量} = \text{収穫槽に24時間で貯まった水量}$$

$$\text{収穫率} = \text{収穫水量} \div \text{培養水量}$$

$$\text{収穫数} = \text{収穫槽のワムシ密度} \times \text{収穫水量}$$

$$\text{比増殖率}(r) = \text{収穫率} + \ln(\text{当日のワムシ密度} / \text{前日のワムシ密度})$$

$$\text{日間増殖率}(\%) = (e^r - 1) \times 100$$

### 改良間引き培養（ケモスタット式間引き培養<sup>30)</sup>の基本構造

#### の基本構造

改良間引き培養は、前述の連続培養の方式から収穫槽を省き、培養槽1槽のみで運転する方式である。改良間引き培養の概念を図2-14に示す。

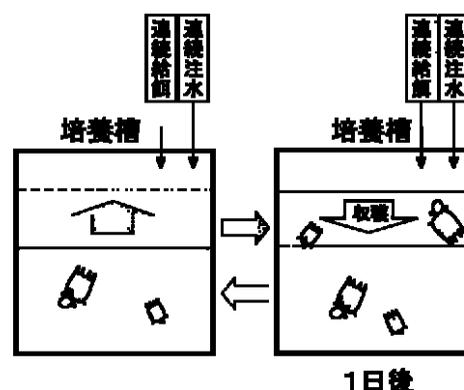


図2-14 改良間引き培養の概念図

装置の基本構成は、収穫槽がなく培養槽のみである他は、注水装置、給餌装置、通気装置、水温調節装置、懸濁物除去フィルター、フタは前述の連続培養と同様である。また、培養槽の上部に注水槽を配置し、バルブ調整により連続的に落水させて注水装置を省いた事例や、注水槽に餌料を添加し給餌装置を省いた事例および水温調節を省いた事例もある。

改良間引き培養の運転は、培養槽に連続注水および連続給餌を行い、24時間に1度、培養水ごと間引いて収穫する。培養管理はケモスタットで行う。

一般的に間引き培養は培養水量から間引いた水量、すなわち、収穫水量/培養水量を収穫率（間引き率）とするが、本マニュアルでは連続培養と同様に考え、収穫後の水量を基準として収穫率、収穫数、比増殖率、日間増殖率は、以下の式により求めた。

$$\text{収穫水量} = \text{培養水から間引いた水量 (前日の}$$

開始培養水量から増加した水量)

収穫率=収穫水量÷前日の開始培養水量

収穫数=培養槽のワムシ密度×収穫水量

比増殖率( $r$ )=収穫率+ $\ln$ (当日のワムシ密度  
/前日のワムシ密度)

日間増殖率(%)=( $e^r - 1$ )×100

### 連続培養と改良間引き培養の長所および短所

連続培養の長所は、培養槽の水量が常に一定なため、環境変化が起こりにくく安定しやすいと考えられることである。また、通常、ワムシが不調となる時には培養槽から不調となることが多く、収穫槽が不調時のリスク分散となる。短所は、水槽が2槽必要であり、そのためのスペースが必要となることである。また、収穫数を計算するために収穫槽のワムシ密度(全雌ワムシ密度のみでよい)も計数する必要がある、計数の手間が少し多くなる。

改良間引き培養の長所は、培養槽1槽のみでよいため、必要なスペースも小さくなり、ワムシ密度の計数の手間も若干減る。短所は、収穫前後で培養水量が変わるため、一定の注水量では注水率(培養水量あたりの注水量)が変化することや、収穫前後で水深も変わるため、エアレーションの通気量と水流が変化することにより、環境変化が起こりやすいと考えられることで、これが培養不調の原因となることもある。また、1槽のみであるため、不調時のリスク分散が必要である。

### 培養槽および収穫槽

培養槽は、底泥の流れ出しやすい構造で、縦型の深めの水槽が適しているが、基本的には水が貯められる構造であれば、工夫次第でどんなものでも使用できる。これまでに100L~4,000Lの水槽を用いた事例がある。水槽の容量は培養密度を考慮した必要な生産量で決まる。すなわち、必要量の生産を行うには、水槽が小型であるほど培養密度は高密度とならざるを得ないが、高密度になるほど厳密な管理・調整が必要となる。ただし、水槽は小型であるほど水温調整や他生物の混入防止等の培養管理は行いやすく、培養を計画的、安定的に進めることができる。一方、大型水槽では水量が多いため、低密度の培養でも必要量の生産が可能で、管理も容易となる。これまでに行った事例はないが、例えば、常水温が20

~30℃程度の時期であれば水温調節せずに、野外の40kL池でワムシ密度50個体/mL、収穫率0.5の連続培養を行えば10億個体の生産が可能である。ただし、原生動物や多種のワムシ、ミジンコ、昆虫等他生物の混入を避けることは困難であることや、収穫時に廃棄する水量が多いため時間がかかることが短所となる。

連続培養に用いる収穫槽は、収穫水量分の水が貯められる容量の水槽であればよく、通常、培養槽と同型の水槽を用いる。これまでに行った事例はないが、同型の水槽を用いれば培養槽と収穫槽をスイッチすることが容易である。すなわち、長期の培養で培養槽に汚れが蓄積したときに、注水と給餌をそれまでの収穫槽に切り替えて、これを新しい培養槽とし、元の培養槽を収穫、洗浄後、新しい収穫槽とする。このことにより、ワムシの状態と水質を維持したままで水槽を洗浄して、培養を継続することができる<sup>3)</sup>。また、本マニュアルの事例では、1つの培養槽に対し1つの収穫槽を設けているが、複数個の培養槽に対し大型の1つの収穫槽とすることもできる。

### 用水および注水方法

用水は、10および0.5 $\mu$ m孔径のワインドカートリッジフィルター(ADVANTEC TCW-10N-PPS, TCW-05N-PPS)でろ過した地下水、50、10および0.5 $\mu$ m孔径のワインドカートリッジフィルター(同TCW-50N-PPS, 他同)でろ過した琵琶湖水、塩素をチオ硫酸ナトリウムで中和あるいは活性炭カートリッジフィルター(同TCC-W1-SOCO)で除去した水道水の使用事例がある。琵琶湖水はフィルターに汚れが詰まりやすく(特に荒天時)、フィルターの交換が頻繁に必要なことや、原生動物等の混入が起こりやすい。水道水は塩素を中和や除去する必要があり、また水道料金が必要である。これらのことから、水質にもよるが地下水の使用を推奨する。

注水方法は定量連続注水が基本である。注水装置を図2-15に示す。使用水に応じたカートリッジフィルターと、簡易な圧力調整用の定水頭給水槽およびバルブからなり、給水槽下部のバルブを調整して、24時間で所定の注水量となるよう連続注水を行う。バルブの調整の方法はメスシリンダー等で1分間あたりの水量を測定して行うが、正確に調整すること

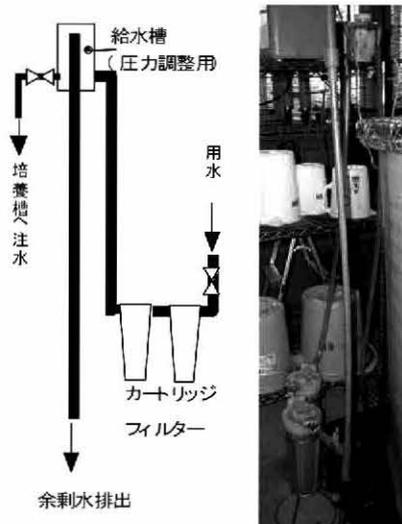


図 2-15 注水装置

は難しく、おおよその調整を行い、翌日から微調整する。

また、この注水方法では注水チューブに気泡が付着し（いわゆる“エアかみ”現象）、注水量が減少することがある。なるべく細いチューブを使用し、流速を早めることにより気泡の付着を抑えることができる。しかし、気温の高い時に水温の低い水（例えば地下水や冷却した水等）を注水する時には、エアかみが起こりやすく、時々チューブを揺すってエアを排出しなければならない。注水に定量ポンプを使用すれば、この現象を回避でき注水量の調整も容易になると思われるが、現在のところ使用事例はない。

#### 収穫率（＝注水率、希釈率）

ケモスタット式の連続培養では、収穫率は一定値に固定する。特に、安定状態での収穫率の変更は、再び安定するまで一定の期間が必要となるため、避けるべきである<sup>19)</sup>。

ツボワムシ滋賀水試株は、水温 26℃の条件で収穫率を 0.5～0.8 で運転している。ツボワムシは拡大培養時などに、しばしば 1 日で 3 倍以上の密度に増殖することがあり、また、増殖率を求める試験(1.5「滋賀水試株の水温別増殖特性」参照)でも水温 26℃では比増殖率 1.28 となった。連続培養の「定常状態<sup>(4)</sup>」は収穫率と比増殖率が等しい時の状態であることからすると、さらに高い収穫率での培養の可能性は考えられる。収穫率を上げるということは、注水が増えることになり、培養槽内の環境抵抗を減らす

ことができると思われる。しかし、増殖能力を超えた収穫率では、培養密度が直ちに減少するウォッシュアウト (wash out) と呼ばれる現象が起こる<sup>19)</sup>。ツボワムシの連続培養は海産ワムシ類の連続培養に比べて、未だ不安定な状態で増殖率が安定しないため、現状では上記の収穫率としている。また、これまでの培養事例から考慮すると、収穫率はクロレラ給餌では 0.7、クロレラ・イースト併用給餌では 0.5 程度が比較的安定しているといえる。

#### 給餌方法

給餌方法は定量連続給餌が基本である。1 日に 1～数回程度の給餌では、一時的に餌密度が高くなりすぎ培養不調の原因となる。給餌装置を図 2-16 に示す。餌料容器に餌料と水を加えて一定量にし、マイクロチューブポンプ (EVELA Micro TUBE PUMP MP-3) により 24 時間で全て滴下するよう、定量連続給餌を行う。餌料容器は、餌料の品質保持のため、クーラーボックス等に入れ保冷剤で保冷し、餌料の沈殿防止のため、エアレーションで攪拌を行う。

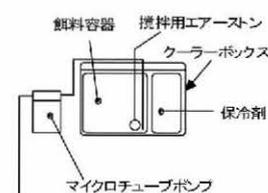


図 2-16 給餌装置

餌料種類は、クロレラ単独またはクロレラとイーストを併用する。クロレラとイーストの併用は培養開始初期から行くと、培養槽内の細菌相が未発達なため、栄養欠乏 (2.2.2.3 ツボワムシ培養の餌料種類「イースト」参照) と考えられる培養不調が起こりやすい。10 日間程度の拡大培養期および拡大培養移行期にはクロレラ単独給餌とし、それ以後、併用給餌を行う。

ケモスタット式の連続培養では、餌料環境が主たる制限要因であり、給餌量を一定値に固定することにより、自律的にワムシ密度が安定した状態に達する。従って、給餌量の調整によりワムシ密度をある程度制御することができる。しかし、給餌量の変更

は、培養系の環境収容力を変更することを意味し、不安定化を招く恐れがあり注意を要する<sup>19)</sup>。

培養水量あたりの給餌量は、これまでの培養事例から考慮すると、培養水 1,000L あたりクロレラ単独では 3.3L、併用ではクロレラ 2L とイースト 0.5kg までが比較的安定している。この給餌量で収穫率 0.5～0.7 の場合、ワムシ密度は約 1,000 個体/mL となる。これ以上の単位あたりの給餌量では有機物負荷が大きくなり、水質が維持できなくなると思われ、培養不調となることが多い。

連続培養中に、ワムシ密度の減少やツボワムシ個体の活性の低下等により、残餌密度が増大する場合がある。残餌密度が 150 万細胞/mL 以上となった場合には給餌量を調整する必要がある、ケモスタット式拡大培養の調整例 (2.2.3.2 100L 槽ケモスタット式拡大培養「表 2-2 給餌量の調整例」参照) に準じて給餌量を調整する。なお、残餌を常にほとんどない状態に運転することが、良好な培養のコツであり、これにより両性生殖雌の出現を抑え、繊毛虫等の大増殖を抑えることができる。

## 通気

通気はプロアおよび微細通気管 (ユニホース FAL5000) により空気通気を行う。

通気量は、溶存酸素量が 4.0mg/L を下回らないよう調節する。ただし、強通気よりも弱通気の方が培養成績が良いので、溶存酸素量が 4.0mg/L 位になるよう、なるべく通気を少なめにするのがコツである。

## 水温管理

水温は、ヒーターおよびサーモスタットにより、通常 26℃ に調節する。夏期にはこれ以上となるため、培養槽の外壁に散水して冷却した事例もある。常水温が 20～30℃ 程度の時期であれば無加温で培養することもできる。また、常水温が 15℃ 程度の低水温期に、屋外で日光により水温上昇をさせた事例もある。この場合、昼夜で水温が変動するが、5℃ 程度の変動であればツボワムシの増殖に大きな影響はないようである。

## その他

培養槽内の懸濁物は、空調用フィルター (サラロック OM-150-25) を垂下し、適時洗浄して除去す

る。大型水槽では懸濁物を弱通気により沈下させることもできる。ただし、この場合には酸欠となりやすいため、ワムシ密度は控えめ (約 500 個体/mL 以下) にしなければならない。

培養槽、収穫槽には原生動物等の混入をなるべく防ぐことと、加温費の節約のため、ビニールシート等でフタをする。

### 2.2.4.3 連続培養の運転工程<sup>19)</sup>

#### ① 培養計画

必要な生産量をまかなえるよう、培養槽の容量に応じた培養密度を計画する。あるいは逆に計画培養密度に応じた容量の培養槽を用意する。2.2.4.2 基本構成および管理方法「培養槽および収穫槽」で述べたように、培養密度は高密度になるほど厳密な管理を要し、低密度であるほど管理は容易になる。また、万一の不調時のリスク分散として、複数の培養を並行しておくことが望ましい。

#### ② 元種の準備および培養開始日の設定

株保存培養から拡大培養により元種を生産するには、1 億個体の生産で、最短でも 10 日は必要となる。そこから、連続培養の収穫を行えるようになるまでにも日数が必要である。例えば、ワムシ密度 1,000 個体/mL の密度で 1000L 槽連続培養を行うには、最短でも 4 日は必要であるが、安定期に至るまでは不調となることが多い。従って、ワムシを必要とする 20 日程度前から拡大培養を始めることを勧める。

別の培養から元種を得るときは、接種可能数と計画密度に応じて、収穫開始日から培養開始日を逆算する。例えば、ワムシ密度 1,000 個体/mL の密度で 1000L 槽連続培養を行うには、2 億個体接種できれば、2 日目には 8 億個体 (800 個体/mL) となることが予想され、この日から収穫を開始するため、3 日前から培養を開始すればよい。ただし、これは培養が順調に進行することを想定しており、安定期前の不調を考慮し、さらに数日前から培養を開始することが望ましい。

#### ③ 培養槽の準備

培養槽・収穫槽や配管、その他培養に関する器具を洗浄し、24 時間以上の塩素消毒 (2.2.2.5

「水槽と用水の塩素消毒」参照）を行う。水温は培養する温度に設定する（通常 26°C）。塩素中和確認後、用水 1,000L あたり 400mL のクロレラを直接添加する。この分量でクロレラ密度が約 500 万細胞/mL となる。

#### ④接種

ワムシ密度を、連続培養時の計画値の 1/5～1/10 程度になるように接種する。これより低密度からの培養も可能ではあるが、拡大培養期が長くなり、ツボワムシが優占するまでの間に原生動物等の混入が起こりやすい。また、接種密度を計画値となるよう接種すれば、拡大培養期を省くこともできる。接種密度が高い場合には、③で添加したクロレラ量では数時間でなくなることが予想され、観察を行って連続給餌で追加を行う。

接種するツボワムシは、良好な状態で培養された活性の高いものを接種しなければならない。繊毛虫等の原生動物は混入していない方が望ましいが、あまり神経質になる必要はない。混入している場合には、収穫ネットに入れて洗浄すれば繊毛虫等は減少するが、完全に除去することはできない。むしろ、ネットで激しく洗浄することにより、ツボワムシを損傷することの方が問題で、一時的に密度が低下する場合がある。

#### ⑤拡大培養期（拡大期）

この時期は、ケモスタット式拡大培養（2.2.3.2 「100L 槽ケモスタット式拡大培養」参照）と同様の管理を行い、ワムシ密度を計画値まで増大させる。この時期には注水をしないため、水の交換がなく、長期にわたると水質が悪化する。従って、この期間は 5 日間以下とし、ワムシ密度が計画値に達していなくても、次に移行した方がよい。接種後数日は、洗浄の影響や環境の急変により、増殖が停滞することがあり、管理に注意を要する。

#### ⑥連続培養移行期（移行期）

拡大期によりワムシ密度が増大した後、収穫を開始し、連続培養状態へ移行する期間である。給餌管理は拡大期と同様であり、計画密度に達していない場合は、給餌量を増量する。一方、注水を開始し収穫を行うため、拡大期ほどのワ

ムシ密度の増加は見込めず、緩やかな増加となる。この時期は、増殖率と収穫率のつりあいが未だとれていない状態であるため、ワムシ密度は上下にふれやすい不安定な状態であり、管理に注意を要する。

#### ⑦安定連続培養期（安定期）

ワムシ密度が計画値に達し、給餌量および注水量を一定に運転し、安定状態となる時期である。初期はワムシ密度がやや増減するが、ケモスタットの管理により、培養槽内のワムシ個体群の比増殖率と収穫率が一致した定常状態となり、数日後には培養槽内のワムシ密度がほとんど一定に推移する。この状態に到達すると安定したワムシ生産を行うことができる。培養密度はこれまでの培養事例から考慮すると、1,000 個体/mL 以下にした方がよい。培養期間は安定状態に達すると、2 カ月以上の培養が可能である。しかし、培養が長期にわたると培養槽に次第に汚れが蓄積するため、30 日程度で培養槽と収穫槽をスイッチするか、一旦終了し培養槽を洗浄後、新しく培養をやり直す方がよい。特に、改良間引き培養では、蓄積した底泥が剥がれて収穫時に混入し、収穫がしづらくなるため長期培養は望ましくない。

### 2.2.4.4 連続培養の毎日の作業

#### 水質測定およびワムシ密度、残餌密度の計数

毎日、一定時間に（収穫前がよい）培養経過を観察する。水温、溶存酸素量、pH の測定およびワムシ密度、残餌密度を計数（図 2-17



図 2-17 計数作業

2.2.2.4「計数方法」参照）する。このうち、水温、溶存酸素量、残餌密度（最重要）、全雌ワムシ密度は、非常に重要で必ず計測しなければならない。

培養が不安定な時は、一定時間以外にも状況を観察する。この時、特に残餌密度に注意を払い、残餌密度が上昇したときには、直ちに給餌量を調節しなければならない。経験的には、培養水の色が緑色に濁った状態は残餌密度が高く、透明感のある状態は

残餌密度が低いと判断できるが、過信は禁物で計数することを勧める。

### 給餌

給餌は、残餌密度計数後、残餌密度に応じて給餌量を調整し、連続給餌で与える。(2.2.4.2 基本構成および管理方法「給餌方法」参照)

### 収穫

収穫は、収穫槽(改良間引き培養の場合は培養槽)の底面のバルブから、培養水とともに収穫ネットに流し入れて行う(図2-18)。収穫ネットは培養水が貯められるバット等の容器内に設置する。



図 2-18 収穫作業

収穫配管の出口は、容器に貯めた水面より上に出ていると、ワムシが気泡にとらわれて死亡するので、管を継ぎ足して水面下に下げる。収穫ネットは、50 μm 程度の目合いのネット地を吹き流し状に加工し、ネットの底を縛って使用する。ネットの加工時に縫合しているミシン目は、接着剤等で目止めを行う。収穫数が多いときはネットの目が詰まりやすいので、ネットを揺るとよい。また、懸濁物が多いとネットの目がすぐに詰まるので、何度かに分けて収穫する必要がある。

### 懸濁物除去フィルターの洗浄

2~3日に1度程度(汚れがひどい時はその都度)、培養槽から懸濁物除去フィルターを取り出し、高圧洗浄機で洗浄する(図2-19)。培養槽から取り出す時に、懸濁物がさらさらと流れ落ちる時より、べったりと付いている時の方が培養が良好な時が多い。残餌がほとんどない安定状態では、懸濁物除去フィルターはほとんど汚れが付着しなくなる。しかし、念のため定期的に洗浄する。



図 2-19 フィルター洗浄作業

## 2.2.4.5 培養不調時の現象および原因

### 繊毛虫等の原生動物の大増殖

繊毛虫等の原生動物は、混入していない方が望ましいが、培養中に発生することが多い。少数では問題にはならないが、残餌が過多になった時、特にクロレラ・イースト併用給餌時に大増殖を起こす場合がある。繊毛虫自体が、ツボワムシに直接影響を及ぼしてはいないようであるが、大増殖すると餌の競合や溶存酸素量の低下を招く。しかし、安定状態が続くツボワムシの活性が高い状態であれば、繊毛虫が混入してもそれほど大増殖はしないため、あまり神経質になる必要はない。繊毛虫は、雄ワムシ位の大きさのものから非常に小さいものまで様々な種類が混入する。繊毛虫以外には、ツリガネムシ類やヒルガタワムシ類、ツキガタワムシ類などが混入することがある。まれに、鞭毛藻類が増殖する時があるが、給餌を控えればツボワムシに捕食されるようで、数日後にはほとんど消滅する。いずれの混入の場合でも、残餌密度に注意を払い、ツボワムシを優占させた状態で培養することが重要である。

### 雌卵携卵個体の異常増加<sup>32)</sup>

通常、雌卵携卵個体率が高いことは培養状態が良いことを示している。しかし、雌卵携卵個体の割合が50%以上となった時、特に複数携卵個体が異常に多くなったときは、水質の悪化により卵がふ化できなくなっている可能性がある。このまま培養を続けると脱落卵が目立つようになり、ワムシ個体数は急激に減少する。脱落卵は卵内での発生が止まった状態であるが、その卵を新鮮な水に入れると発生が進み、ふ化することがある。そのため、給餌を止め注水のみを行い培養水を希釈すれば、復調する場合もある。しかし、一時的な密度の大幅な低下と培養の遅れは避けられない。

### 携卵個体率の低下

携卵個体率が低下し、非携卵でかつ大型の雌ワムシが多くなるときがある。これは水質の悪化等の原因により、環境抵抗が増大し増殖率が低下したため、高齢ワムシが多くなった状態と考えられ、この後、ワムシ個体数は急激に減少する。給餌を控え注水を増やして培養水を希釈すれば、復調する場合もある

が、仔ワムシが全く見られない状態では復調は困難である。一方、培養不調から復調する時にも、携卵個体率が低下する場合がある。この場合は小型の非携卵雌が多く（仔ワムシを含む）、一時的なもので問題はない。

### 両性生殖雌の増加

残餌密度が高い日が数日続くと、耐久卵携卵雌や雄卵携卵雌の両性生殖雌が増加する。これらは増殖に寄与しないため、あまりにも多いと翌日以後の密度の低下が予想される。同量の給餌を続けると、ワムシ個体数は減少し残餌密度がさらに高くなることになるため、給餌量を減らす必要がある。残餌がほとんどない状態で培養を行うことが、両性生殖雌を増加させず、培養を好調に保つことにつながる。

### 泡の発生

比較的粗い泡が発生する時は、培養が好調な時が多い。しかし、粗い泡があまりにも多く発生し、培養槽から噴きこぼれる程（図 2-20）になると、この時点では培養が好調であるが、数日後にワムシ個体数が減少することがある。この現象は、注水量が少ないときに起こりやすく、拡大培養期にこの状態になったときは、注水を開始した方がよい。また、細かい泡が多く発生する時は、培養不調の場合が多く、この時には残餌密度も高いことが多いため、給餌量の調整が必要である。



図 2-20 泡立ち噴きこぼれ

### 微小な懸濁物

残餌密度が低いにも関わらず、ワムシ密度が伸び悩む時がある。この場合、餌料がフロック化している場合が多く、懸濁物除去フィルターで除去できないほどの細かい懸濁物が多い時は、培養が不調に陥っている場合が多い。この後、繊毛虫等が大発生することが多い。この状態では、計数上は残餌密度は低いですが、結局のところ残餌となっているため給餌量

の調整が必要である。

### 後側方棘の長い個体の発生

後側方棘の長いツボワムシ（1.3 滋賀水試株の形態「形態の変異」参照）は、培養初期や復調時に見られることがあるが、安定期にはあまり見られない。安定期において、ある日突然、後側方棘の長い個体が目立つようになると、水質が急変していると推察され、数日後にはワムシ個体数が激減することがある。この時には、注水による希釈を増やすか、培養水を交換した方がよい。

### 直射日光

クロレラは淡水では生きているため、直射日光下では増殖し、炭酸同化作用によりpHを上昇させる。長期の培養となり、アンモニア態窒素が多い状態の時に、培養水中のクロレラ密度が高いとpHの上昇により強毒性の非解離アンモニア(用<sup>②</sup>)が増えることが推察され、ツボワムシ個体数の急激な減少が起こる。残餌密度に注意を払い、残餌がなるべく少ない状態にすることはこの点でも需要である。さらに、培養槽には直射日光が入り込まないようにする必要がある。また、非解離アンモニアは高水温でも増加するため、直射日光下の屋外培養では夏期に遮光することは不可欠である。遮光をしないと壊滅的な結果となることがある。

### 気圧の急低下

このことと培養不調は、ただの偶然の一致で関係は全くないかもしれない。しかし、これまでに気圧の急低下後、培養不調となったことが数度あるため記載しておく。培養が安定している状態ではさほどの影響はないが、培養が不安定な状態では、気圧の谷の通過や台風の通過等で気圧が急低下するときに、培養が一気に不調となる場合がある。気象のことであり、原因の除去といった対処はできないが、例えば、不安定となりやすい拡大期には給餌量の増量を控えたり、不安定な培養状態の時は給餌量を少なめに調整するようにしている。