

## 循環濾過式飼育技術について (総説) 第2報 種苗生産への適用

齊藤節雄

北海道立総合研究機構栽培水産試験場

Recirculating aquaculture system (RAS) (Review) II. Applications of RAS to seed production

SETSUO SAITO

Mariculture Fisheries Research Institute, Hokkaido Research Organization, *Muroran, Hokkaido, 051-0013*,

The application of RAS to seed production has been recently developed not only for reducing production costs but also for preventing disease outbreaks. Biological filtration is a key technology for RAS. The aim of this review is to identify the water quality-improving novel bacteria (anammox) and archaea that are required using molecular techniques and to apply the results to biological filtration, and to describe enrichment culture techniques and immobilization technologies for the microorganisms. RAS technology has been applied to prepare a stable, automatic culture of rotifers. The technology has also been used for low-salinity rearing water for improving the growth and survival of seeds. The production of marine species at the larval stage has shown benefits in terms of increased growth, survival, and health as a result of biologically treated, conditioned, or matured water containing probiotics.

キーワード：アーキア，アナモックス，シオミズツボウムシ，種苗生産，循環濾過，低塩分，プロバイオティクス

北海道における栽培漁業技術開発は、開始されてから約40年が経過した。これまでに、実に様々な魚種について種苗生産に関する試験研究が実施されてきた。魚類、貝類、甲殻類等々50種近くある (Table 1)。しかし、実際に「事業化」され、大量種苗生産、大量放流が実施されている魚種は多くはなく、その代表的なものはエゾアワビ、エゾパフンウニ、キタムラサキウニ、ヒラメ、クロソイ、ニシン、マツカワ等である (北海道水産林務部水産振興課：栽培漁業基本計画の概要 [http://www.pref.hokkaido.lg.jp/sr/ssk/kihon/fifth/gaiyo\\_ki.htm](http://www.pref.hokkaido.lg.jp/sr/ssk/kihon/fifth/gaiyo_ki.htm)) (2014.5.23)。

近年、栽培漁業を取り巻く環境は厳しさを増し、事業効果において従来からの一代回収型の栽培漁業では、採算性の面で立ち行かなくなることも危惧されている (北田, 1998; 水産庁; 早乙女, 2009)。種苗放流に掛かるコストでは、種苗生産・中間育成に掛かるコストが大きな割合を占めており、その内訳としては、人件費を除けば飼育水の揚水・送水ポンプの電気代、水温の調整等に掛かる燃油代等の経費が大きく、餌代を加えるとほぼ80%に達する (鴨志田, 2008)。

我が国の栽培漁業における種苗生産は、基本的に海の近くに陸上施設を建設し、前浜から揚水した海水を掛け流して飼育する方式が一般的である。このシステムは、常に新鮮な海水が供給されるため、水質を良好に保つことが比較的容易である反面、取水、濾過、調温のために、電気・ガス代等が常に掛かるため、施設の維持を含めたランニングコストが嵩む。施設の規模が大きくなり事業規模となれば、建設のためのイニシャルコストも莫大になる。

栽培漁業は、費用対効果の観点から一層の経費節減が求められており、これまでも、飼育技術の向上や安価な餌の使用、人件費等の節約を行ってきたが限界がある。経費の内大きな割合を占める燃油代等を含む光熱費を節減するためには、やはり、揚水、濾過、調温等の飼育システムそのものに踏み込んだ「抜本的」な改良が必要である。

魚介類を飼育する際に、一度使用した海水を繰り返し再利用する方法として、「循環濾過式飼育システム (RAS)」がある。RASを用いた養殖のメリットとしては、①防疫



対策が容易（取水を介した病原体の侵入の回避）、②安全・安心な生物生産（薬剤の不使用と海洋汚染等からの回避）、③ランニングコストの削減（加温、冷却に掛かるエネルギーの低減）、④海に依存しない生産システムの構築も可能（人工海水、地下海水の利用）、⑤排水処理等管理の徹底による環境保全等がある。特に近年種苗生産におけるコスト削減が大きな課題として扱われ、飼育水の加温・冷却に掛かるエネルギーコストの低減化が期待される本システムの必要性が高まって来ている（マリノフォーラム21種苗生産システム研究会，2000；遠藤，2012）。

海外では、RAS技術を種苗生産に適用する取り組みが2000年代から盛んになっており（Attramadal *et al.*, 2012; Lee and Ostrowski, 2001; Verner-Jeffreys *et al.*, 2003），我が国では、独）水産総合研究センターにおいて主に海産魚類を対象に技術開発が進展している（山本，2011）。北海道においても、既に数多くの種苗生産施設が稼働しており（北海道水産林務部水産振興課：海域別栽培漁業推進計画の概要 [http://www.pref.hokkaido.lg.jp/sr/ssk/kihon/fifth/gaiyo\\_ka.htm](http://www.pref.hokkaido.lg.jp/sr/ssk/kihon/fifth/gaiyo_ka.htm)）（2014.5.23），栽培漁業の今後の発展を考えると、極力エネルギーコストを削減し、種苗生産コストの抜本的な低減化を図ることが重要である。本稿では「種苗生産」に焦点を当て、循環濾過式飼育システムを種苗生産に適用する際に必要となる技術について概観する。

## 1. 循環濾過式飼育システムを種苗生産へ適用する際に必要となる要素技術

種苗生産における循環濾過式飼育システムについても、いわゆる養殖を目的とした循環濾過式養魚システムと、基本的なシステム構成において大きく変わるところはない。しかし、孵化仔魚や幼生から飼育が開始されるため、餌としては、生物餌料であるシオミズツボワムシ（以下ワムシ）やアルテミア、或いは植物性プランクトンが与えられ、更に飼育水にもいわゆる「水づくり」のために、クロレラ等の植物性プランクトンが添加されるのが一般的である。従って、孵化仔魚や幼生の飼育段階においては、ほぼ止水状態で飼育される。水質の状況を見ながら徐々に循環を開始し、水質の浄化を促すことになる。循環ポンプによる飼育水の換水率が高いと、生物餌料であるワムシ、アルテミアの損失が多くなり非効率であるため、生物餌料を回収、再利用することが必要となる。また、飼育水中のクロレラ等植物性プランクトンが有機懸濁物除去のためのゴミ取り装置により排出されることも、仔魚期の飼育にとっては問題である。

循環濾過式養魚システムでは、循環ポンプにより飼育水をシステム内で循環させることで、魚介類飼育水槽からの排水を受水槽に受け、泡沫分離装置によりゴミ等を

除去し、熱交換機で調温した後、生物濾過器で水質を浄化（アンモニア、亜硝酸等の除去）し、紫外線装置等で殺菌・消毒した後、飼育水槽へ給水する。この水処理工程で最も重要なのが生物濾過装置であり、アンモニア→亜硝酸→硝酸→脱窒の分解過程を担うバクテリアである。バクテリア（硝化・脱窒細菌）の分解性能の向上がキーポイントとなる。生物濾過器のコンパクト化、高性能化がコスト低減化の観点から極めて重要である。新水の供給をほぼゼロにする「閉鎖」循環濾過飼育システムにおいては、硝化工程で生成される硝酸が高濃度に飼育水中に蓄積されるため、硝酸を窒素ガスとして除去する脱窒工程が必要である。

魚類の種苗生産においては必須の生物餌料であるワムシの培養に、循環濾過システムを適用した生産技術の開発が今世紀に入り盛んになっている。安定した培養生産による生物餌料の確保のみならず、培養システムの機械化、自動化を図ることによる省力化、低コスト化が期待される。取水した海水中には病原性の微生物が含まれている可能性があるため、紫外線照射や電解海水による殺菌が必要である。病原体フリーの人工海水を利用すれば、疾病対策は万全であるが、購入コストが問題と成る。

水産増養殖において、魚病が発生した際の対処法としては、従来から薬剤の投与がある。抗生物質が使用され、病原微生物を排除することが行われてきた。しかし、耐性菌の出現等問題も多く、安易に抗生物質に頼らない魚病対策が求められている。この様な背景から水産分野においても、プロバイオティクスの有効活用が注目される様に成ってきた。「掛け流し」飼育に比べ、飼育水中のプロバイオティクス菌の量的コントロールが容易と考えられる循環濾過飼育における活用が期待される。

これらの要素技術について、①生物濾過装置の機能向上、②ワムシ培養への適用、③人工海水の利用、④プロバイオティクスの利用の順に解説する。

## 2. 生物濾過装置の機能向上

硝化細菌には、アンモニア態窒素を亜硝酸態窒素に酸化する細菌群と亜硝酸態窒素を硝酸態窒素に酸化する細菌群とがあり、濾材熟成過程におけるそれぞれの増殖特性が異なることが知られている。両細菌群共に十分に熟成させるためには、少なくとも3カ月間は必要とされている。また、循環濾過式飼育システムにおける生物濾過器は、従来からブラックボックスとして扱われ、濾材に繁殖する細菌の同定や定量化は直接行われず、水質変化により熟成状況を見極め、システムの運転条件を決めているのが現状である。

海水中に存在する硝化・脱窒細菌の増殖を促すだけで

なく、積極的に優れた硝化・脱窒能力を持つ細菌を探索、選抜、株培養し、必要に応じて随時生物濾過器における利用を図ることが重要である。高分子の透過性ビーズに包括する微生物固定法も開発されており (Sumino *et al.*, 1991; 1992), より効率的な培養, 定着技術への応用が望まれる。

近年下水処理水の有効利用のため, 高度な処理が必要とされ, 特に都市部においては, 新たな敷地確保の困難性から省スペース施設が求められている。そのため標準活性汚泥法に替わる新しい下水処理プロセスとして, 硝化細菌を曝気槽内部に高濃度に保持できる濾過法や担体投入法が採用され, 反応槽の小型化と硝化処理の安定化のための技術開発が行われている。これら排水処理分野における技術は, RAS技術の改良へ, 更には種苗生産へ適用され, 生産コストの削減が期待される。

## 2.1 微生物の固定化

酵素, 微生物等の生体触媒を, 活性を維持した状態で水に不溶性にすることを「固定化」という。微生物を担体に固定化する方法は, 包括法と結合法に大別される。包括固定化法は, 発酵産業で実用化されており (千畑, 1975), 排水処理においてもバイオリアクターの開発が進められて来た (Hashimoto *et al.*, 1986; 橋本, 1989; 江森ら, 1995)。結合固定化法では, ポリエチレングリコール等を主材料として硝化細菌を高濃度に保持した担体が開発され, この担体を濾過槽に添加することで, 反応槽のコンパクト化を図り, 従来の硝化法と同等の滞留時間で, BODと窒素の同時処理が可能な窒素除去リアクターが開発されている (宮崎・中原, 2002)。

### 2.1.1 包括固定化法

包括固定化法は, ポリエチレングリコールやポリビニルアルコール等の水溶性高分子と微生物を混合し, 水溶性高分子を重合, ゲル化させることで, 高分子ゲルの格子中に微生物を固定化する方法である。担体の形状は通常立方体や直方体で, 材質にはポリエチレングリコール, ポリビニルアルコール等が使用されている。包括固定化法は, 直ちに活性化できる長所もあるが, 固定化操作や固定化後の貯蔵条件に制約が多い。

循環濾過飼育システムに本法を適用した研究が多く報告されている (Nilson *et al.*, 1980; 植本ら, 1991, 1993, 1994; 渡部ら, 1993; Nagadomi *et al.*, 1999; Sung-Koo *et al.*, 2000; Seo *et al.*, 2001; Jae-Koan *et al.*, 2001; Park *et al.*, 2001; Tal *et al.*, 2003; Achuthan *et al.*, 2006; Kumar *et al.*, 2009)。しかし, 種苗生産への適用には至っていない。

### 2.1.2 結合固定化法

結合固定化法は, 砂や活性炭, プラスチックビーズの様な水に不溶性の担体表面に微生物を, 微生物自身が生産する粘性物質を介して自然発生的に付着させ生物膜を形成させる方法である。担体の形状は, 球状, 円柱状, 中空円筒状, 立方体, 直方体等であり, 材質にはポリエチレングリコール, 化学修飾セルロース, ポリウレタンフォーム, ポリビニルアルコール, 発泡ポリプロピレン, ポリエステル球状繊維塊, 高密度ポリエチレン等がある。

結合固定化法で作成されたポリプロピレンを基材とする中空筒状の固体で, 表面に微細な凹凸を設けているものでは (宮崎・中原, 2002) 次の様な特長がある。1) 比表面積が大きく, 大量の微生物を保持できる。2) 比重が水に近く, 反応タンク内で均一に分散できる。3) ポリプロピレンは, 生分解されず, 物理的強度が高く, 摩耗に強く, 担体の補充が不要。4) 硝化細菌等増殖速度が小さい有用微生物を反応タンク内に保持でき, 湿潤状態の保存が不要なため, 保管が容易である。

## 2.2 新規生物学的窒素除去

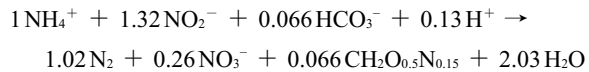
一般的に生物学的窒素除去法は, アンモニア酸化細菌及び亜硝酸酸化細菌を用いた好気条件で $\text{NH}_4\text{-N}$ を酸化する硝化工程と脱窒細菌を用いた嫌気条件で $\text{NO}_2\text{-N}$ ,  $\text{NO}_3\text{-N}$ を窒素ガスに還元する脱窒工程とを組み合わせた硝化/脱窒法が最もよく知られている。

排水処理プロセスにおいては, 硝化/脱窒法の欠点とも言える硝化工程でのpH制御と多大な曝気動力, そして脱窒工程での多量の有機物 (メタノール等) の添加に伴う処理費用増加の問題を解決するために様々な変法が開発されてきた。しかし, 硝化工程と脱窒工程の組み合わせであることと, そこで利用される生物種はほぼ同じであるため, 根本的な解決には至らなかった。

硝化細菌は, 今から100年以上も前にその存在が証明されており, 硝化/脱窒は各々の細菌が担うものと考えられていた。しかし, 近年新たな細菌が発見され, 学術的にも実用上も注目を集めている。

### 2.2.1 アナモックス (Anammox)

1995年オランダのデルフト工科大学の研究グループにより発表されたAnammox (嫌氣的アンモニア酸化; Anaerobic Ammonium Oxidation) は, 全く新規な生物学的窒素除去プロセスである (Mulder *et al.*, 1995; van de Graaf *et al.*, 1995)。Anammox反応は, 亜硝酸 ( $\text{NO}_2\text{-N}$ ) を電子受容体としてアンモニア ( $\text{NH}_4\text{-N}$ ) を酸化する微生物による酸化還元反応であり, 次式で表され, アンモニアと亜硝酸を直接窒素ガスに変換する。



すなわち、1モルのアンモニアを除去するために、1.32モルの亜硝酸を必要とし、1.02モルの窒素ガス（N<sub>2</sub>）と0.26モルの硝酸（NO<sub>3</sub>-N）を生成する。この反応は無酸素条件下で起こること、また、有機物を必要としない独立栄養性生物による反応であることから、従来の硝化/脱窒法とは全く異なった新しい反応である（Strous *et al.*, 1998）。

Anammox微生物は、アンモニアと亜硝酸を基質とする性質の他に、増殖速度が0.0027（h<sup>-1</sup>）、すなわち倍加時間が10.7日であり、増殖速度が極めて遅い。また酸素への暴露により可逆的な反応阻害を受けるといった性質を有する（Strous *et al.*, 1997a）。また、基質となる亜硝酸は100 mgN/L以上の濃度になるとAnammox反応に阻害を与える（Strous *et al.*, 1999a）。温度やpH等、増殖に適する条件を調べた報告では、至適pHは7.0~8.5（最大速度は8.0）、至適温度は30~36℃付近である（Strous *et al.*, 1997b）。

Strous *et al.* (1999b) は、排水処理工程におけるAnammox反応槽から取り出したバイオフィルムを構成する細胞の16S rRNA遺伝子の塩基配列を調べた。彼らはAnammox菌が、これまで知られていた最も近いバクテリアでも相同性が80.2%しかなく、Planctomycetes門に属する新規な細菌であることを発見した。その後Anammox反応に関する研究報告が数多く出されている。Anammoxに関与する微生物が複数存在し、環境中に広く分布し、地球上の窒素サイクルに大きな割合を占めている可能性が指摘されており（Kuypers *et al.*, 2003; Dalsgaard *et al.*, 2003; Trimmer *et al.*, 2003; Kuypers *et al.*, 2005; Tal *et al.*, 2005; Meyer *et al.*, 2005; Trimmer *et al.*, 2005; Hu *et al.*, 2011）、これまでに、*Candidatus* ‘Brocadia’, ‘Kuenenia’, ‘Scalindua’, ‘Anammoxoglobus’, の4グループが知られている（Penton *et al.*, 2006）。

## 2.2.2 アナモックス菌の利用

### 2.2.2.1 排水処理分野における利用

排水処理場における従来の窒素処理技術は、生物学的硝化/脱窒法が用いられており、排水中のアンモニアを硝化細菌により全量硝酸へ酸化する硝化工程とその硝酸を有機物（メタノール等）と共に脱窒菌により窒素ガスに変換する脱窒工程を経る。硝化工程での多大な曝気動力や脱窒工程での多量の有機物添加を必要とし、処理コストの増加が課題となっている。

アナモックス反応を用いた窒素処理システムでは、独立栄養性のアナモックス菌により嫌気条件下で、アンモニアと亜硝酸を直接窒素ガスに変換する。排水処理等の

分野においても活性汚泥の成分として重要性が増している（Strous *et al.*, 1997b; Toh *et al.*, 2002; Schmidt *et al.*, 2003; Egli *et al.*, 2003; Dapena-Mora, 2004; Jianlong and Jing, 2005; Isaka *et al.*, 2007; Pathak *et al.*, 2007; Hsia *et al.*, 2008）。

アナモックス反応を用いた窒素処理システムは、アナモックス槽の前段に、約半量のアンモニアを亜硝酸に酸化する亜硝酸型硝化槽を付加した2槽型のシステムとなる。アナモックス菌及び硝化菌を各々包括固定化した担体を各槽に使用し、担体内でアナモックス菌や硝化菌をそれぞれ高濃度に保持し、高い処理速度と安定性能が得られる。従って、アンモニアを約半量だけ亜硝酸に酸化することで曝気動力の削減ができ、かつ有機物を添加することなく窒素ガスに変換できるため、省エネルギー、低コスト型の窒素処理システムである（木村・井坂, 2013）。

アナモックス菌の集積培養に関しては、Nakajima *et al.* (2008) が初めての成功例とされ、NH<sub>4</sub>Cl, NaNO<sub>2</sub>を海水に添加しながら、約1年間継続培養した。16S rRNA遺伝子を調べた結果、*Candidatus* ‘Scalindua wagneri’ と同定された。集積培養は、生物濾過器における濾材の熟成を早める意味で極めて有効とされており、その後も研究開発が続けられている（Lopez *et al.*, 2008; van de Vossenberg *et al.*, 2008; Kawagoshi *et al.*, 2009; Kawagoshi *et al.*, 2010; Ni *et al.*, 2010; Shen *et al.*, 2012; Gao *et al.*, 2012）。また、細菌群のメタゲノム解析（van de Vossenberg *et al.*, 2013）を行う際にも活用される。

### 2.2.2.2 循環濾過飼育における利用

Tal *et al.* (2006) は、循環濾過飼育における生物濾過器の濾材に形成されたバイオフィルムを16S rRNA遺伝子解析によりアナモックス菌を分離し、嫌気的アンモニア酸化に関与していることを初めて報告した。その後Lahav *et al.* (2009) は、脱窒反応におけるアナモックス活性を定量的に解析し、循環濾過飼育システムにおける生物濾過器への応用研究が続けられている。

## 2.2.3 アーキア (Archaea)

古細菌（アーキア）は、バクテリアと形態はほとんど同一であるが異なる系統に属し、16S rRNA遺伝子解析から得られる進化的な類縁性は、細菌と真核生物も離れている。一般的にはメタン菌、高度好塩菌、好熱好酸菌、超好熱菌等が知られており、いわゆる極限環境に生息する微生物である。

しかし、近年極限環境だけでなく、より温和な環境にも古細菌が存在し（DeLong, 1998）、例えば極地の海、湖等の冷たい環境において、古細菌の遺伝子が高頻度で検

出されている (Lopez-Garcia *et al.*, 2001)。その他に海洋 (DeLong, 1992; Fuhrman *et al.*, 1992; Konneke *et al.*, 2005; Hallam *et al.*, 2006; Mincer *et al.*, 2007; Agogue *et al.*, 2008; Beman *et al.*, 2008; Abell *et al.*, 2010), 土壌 (Ochsenreiter *et al.*, 2003) 等の一般的な条件にも古細菌は存在し, メタゲノム解析等の手法によりその存在が明らかにされつつある (Venter *et al.*, 2004; Treusch *et al.*, 2005; Biddle *et al.*, 2008; Walker *et al.*, 2010)。

一般的な海洋においては, 細菌数当たりで微生物の約20%を古細菌が占めている (DeLong and Pace, 2001)。2005年に純培養が報告されたCrenarchaeotaに属する*Nitrosopumilus maritimus*を含む海洋性アーキアは, アンモニア酸化作用を持ち, これら生物が海洋の炭素, 窒素サイクルに重要な役割を果たしている (Francis *et al.*, 2005)。

古細菌の窒素循環への関与が近年注目されており, メタゲノム解析により, アンモニアモノオキシゲナーゼ遺伝子 (*amoA*, *amoB*, *amoC*) を有するCrenarchaeotaが海洋, 土壌何れにおいてもアンモニア酸化細菌を遙に上回ることが示されている (Leininger *et al.*, 2006; Wuchter *et al.*, 2006; Francis *et al.*, 2007)。

### 2.2.3.1 排水処理分野における利用

アーキアのアンモニア酸化能力に注目し, 排水処理への利用が試みられている (Park *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2009; Kayee *et al.*, 2011; Wu *et al.*, 2013; Limpiyakorn *et al.*, 2013)。集積培養に関しても近年研究が盛んになりつつある (Santoro and Casciotti, 2011; Jung *et al.*, 2011; Xu *et al.*, 2012)。

### 2.2.3.2 循環濾過飼育における利用

循環濾過システムにおける生物濾過槽からもメタゲノム解析によりアーキアが分離されており (Konneke *et al.*, 2005), 生物濾過プロセスにおける有効活用が期待されている。硝化・脱窒工程を担うバクテリアやアーキアの同定, 定量化, 更に固定化技術を応用した生物濾過器の立ち上げの迅速化と安定化を図るためにも, 遺伝子解析技術を駆使した研究開発が望まれる。

## 2.2.4 硝化脱窒細菌の挙動把握のための菌の同定と機能遺伝子の定量

処理プロセスの高度効率化, 省エネルギー, 低コスト化を考慮すると, 処理に携わる微生物個体群の変遷と, それら微生物の活性及び生物濾過の特性を結びつけ, 工学的に評価, 解析することが重要である。

しかし, 既存の技術で単離, 培養できる微生物は全体の数%に過ぎず, 微生物の挙動や群集構造全体を把握す

ることは困難であるため, 単離, 培養を必要としない分子生物学的手法の導入が重要である。水処理プロセス内の微生物叢を構成する細菌の同定, 定量には, クローニング法, シーケンス法, T-RFLP法, FISH法, DGGE法等のDNA解析技術が用いられている。

一方, 亜硝酸イオンを一酸化窒素に還元する亜硝酸還元酵素 (Nitrite Reductase; NIR) をコードする*nir*遺伝子をPCR法で特異的に検出することにより, 脱窒細菌叢を評価することもできる (Braker *et al.*, 2000; Prieme *et al.*, 2002)。Real time PCR法を用いた脱窒細菌が有する*nirS*遺伝子の定量法が確立されている (Gruntzig *et al.*, 2001)。脱窒細菌の異なる種では, *nirS*遺伝子又は*nirK*遺伝子のどちらか一方を保有する (Braker *et al.*, 1998) とされており, アーキアにおいても同一種からそれぞれ一方の遺伝子が検出されている (Abell *et al.*, 2010; Lund *et al.*, 2012)。

## 3. ワムシ培養への適用

ワムシ (*Brachionus plicatilis*) は, 海産魚の種苗生産においては, 必須の餌料プランクトンであり, 安定した培養を行うことが, 種苗生産の成否を決めると言っても過言ではない。ワムシは, 大きさ約100~300 $\mu$ mの動物性プランクトンであるが, 単一の種では無く, 遺伝的には14種以上に分類される複合種である (福所・平山, 1989)。種苗生産の現場では, SS型, S型, L型と便宜的に大きさが3つのグループに分けられている。元来, 養鰻池でしばしば大発生して「水変わり」を起こす有害動物プランクトンの一種 (伊藤, 1957) であったが, 1960年代に魚類の初期餌料として利用され (伊藤, 1960), 1970年代の種苗生産技術の飛躍的發展に大きく貢献した。

### 3.1 従来型培養法

従来から採用されているバッチ式の回分培養法や間引き式の培養法等の技術は既に確立している (桑田, 2000a) が, 新たに高密度培養法 (Yoshimura *et al.*, 1997; Hino *et al.*, 1997) や連続培養法 (Fu *et al.*, 1997; 桑田, 2000b) が開発された。バッチ式培養法は, 通常2~3日於きにワムシを植え継ぎながら培養, 管理する方法であり, 植え継ぐ度に水槽の洗浄や水溜の作業が必要であり, 多くの手間が掛かる培養法である。また, これらの作業を頻繁に行うことで, ワムシの培養不調の原因となる細菌や原生動物の培養槽への混入等のリスクの高まることが指摘されている (桑田, 2000b)。

### 3.2 循環濾過式培養法

近年ワムシ培養の更なる効率化, 省力化, 安定化のため, 循環濾過システムを組み込んだ培養法が試みられて

いる。ワムシの循環濾過式連続培養法は、新たな海水を全く補給しないため、必然的に廃水も出ず、極めて環境に優しい培養法でもある。循環濾過式飼育システムの構成要素である生物濾過装置、泡沫分離装置、オゾンあるいは紫外線殺菌装置等をワムシの連続培養装置に組み込んだ培養法が、近年盛んになって来ている。国内では水産総合研究センター（森田，2011）が、海外ではヨーロッパ（Suantika *et al.*, 2000, 2003; Attramadala *et al.*, 2010）、アメリカ（Bentley *et al.*, 2005; Delbos and Schwarz, 2009）を中心に、循環濾過システムを組み込んだワムシ培養法が試みられ、機械化、自動化も図られつつある（Sananurak *et al.*, 2009）。

水産総合研究センターで採用されている培養システムでは、培養槽1基に対して収穫槽1基と収穫したワムシを受ける水槽1基でこの水槽にゴミの除去する泡沫分離装置1基が連結しており、次の生物濾過槽でアンモニア等を硝化細菌により無害化した水を再び培養槽に戻す。ワムシ培養の際に培養水中に蓄積するアンモニアを生物濾過装置で無害な硝酸に酸化し、泡沫分離装置で浮遊物や微細なゴミ等を除去し、培養水を殺菌することで感染症の発生等の予防が期待される。

#### 4. 人工海水の利用

通常種苗生産においては、前浜から取水した海水をろ過することで用水として使用している。しかし、その際に病原体が侵入する危険性は常について回り、紫外線殺菌等の処理の有効性が示されてはいる（Summerfelt *et al.*, 2009）ものの、事業規模となれば、処理する水量は莫大なものとなり、コスト増が懸念される。そこで、循環濾過飼育の用水に人工海水を用いることが出来れば、疾病対策は完璧なものとなる反面、購入コストが問題と成る。

一般に市販の人工海水は、観賞魚用に多くの商品が開発され、海水の取水が困難な立地の水族館等での利用や研究機関等における小規模な飼育実験の環境精度の向上を目的に使用されている（山本，2008）。

##### 4.1 好適環境水

最近、低塩分環境下での種苗生産や低塩分人工海水（好適環境水）を用いた海産魚の飼育事例が報告されている（山本，2010）。従来から海産魚の種苗生産において低塩分海水を用いた仔稚魚の飼育事例が報告されており、成長、生残に好成績が得られている（森実ら，1983；御堂岡・飯田，2006；今井ら，2010；御堂岡，2011）。

魚類の体内浸透圧は、海水より低く淡水より高い。好適環境水は、魚類本来の体液に極力近づけたイオン組成と浸透圧であるため、浸透圧調節のためのエネルギーが

不要となり、その分成長が良好と成り（Canagaratnam, 1959; Lall and Bishop, 1976; Arunachalam and Ravichandrarreddy, 1979；齊藤ら，1990）、種苗生産においては特に生残率の向上に繋がると推察される。

循環濾過飼育においては、飼育水の塩分濃度を最適に保持することは、比較的容易に制御可能であることから、その有効活用が期待される（Riche *et al.*, 2012）。人工海水を利用する際には、コスト面のデメリットが大きな障害である。安価な人工海水の開発、あるいは、対象種の発育段階毎の最適な塩分濃度を探ることで、人工海水の使用量の低減化を図ることも可能であろう。

#### 5. プロバイオティクスの利用

近年魚介類の疾病対策として、抗ウイルス活性を有する細菌や抗細菌活性を持つバクテリアが腸内細菌から発見され、抗生物質等の薬剤に頼らない、環境にも優しい方法が注目されている。免疫系の未発達な仔稚魚期（Uribe *et al.*, 2011）においては、特に有効と考えられている。抗ウイルス活性を有する細菌に関する研究としては、吉水・笠井（2007）があり、海産魚における種苗生産現場への適用が期待されている。また魚介類のプロバイオティクスに関する研究（杉田，2007）も盛んになり、ビタミン等生理活性物質の供給、消化酵素の生産、免疫増強、抗菌物質の産生等の効果が認められており、養殖等飼育技術の改良への応用が図られつつある。

これまでに日本のみならず海外においても、プロバイオティクスに関する研究が過去30年程続けられており、多くの総説が発表されている（Gatesoupe, 1999; Gomez-Gil *et al.*, 2000; Verschuere *et al.*, 2000; Irianto and Austin, 2002; Balcázar *et al.*, 2006; Farzanfar, 2006; Vine *et al.*, 2006; Tinh *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2008; Kesarcodi-Watson *et al.*, 2008; Ninawe and Selvin, 2009; Yousefian and Amiri, 2009; Merrifield *et al.*, 2010; Prado *et al.*, 2010; Nayak, 2010; Aguirre-Guzmán *et al.*, 2012; Mohapatra *et al.*, 2013）。

##### 5.1 プロバイオティクスの定義と意義

プロバイオティクスとは、原生動物の生産物で、他の原生動物の増殖を促進する物質を表すとされ、Lilley and Stillwell（1965）によって初めて提唱された。その後、動物の腸内細菌叢に効果的な作用を及ぼす栄養補助剤として用いられる様になり（Parker, 1974）、更にFuller（1989）は、宿主の腸内細菌叢組成を宿主の健康増進あるいは成長促進に有効な状態に保つ微生物と定義した。

プロバイオティクスの意義は無菌動物が、より容易に罹病することからも推測できる。プロバイオティクスは、微小藻類、酵母、グラム陽性菌、グラム陰性菌等を含む

微生物又は微生物が産生する物質で、宿主に対して健康に良く、養殖においては、病気の制御に用いられ、サプリメント飼料や抗生物質の代わりにも使用される (Irianto and Austin, 2002)。すなわち、プロバイオティクスと病原体とは、消化管内において空間的占有や栄養素の競合が生じ、宿主の免疫系が刺激されると共に、食欲増進、ビタミン産生、解毒、不消化物の除去等の作用がある。

## 5.2 プロバイオティクスの選択基準

一般的にプロバイオティクス候補菌の選抜基準 (Vine *et al.*, 2006) としては、まず、病原性が無いこと。培養が容易で、大量に培養可能であること。腸管に生きて届き、腸管上皮に棲みつき増殖、定着するものであること。病原体と拮抗し、宿主の健康に貢献すること。宿主の生体で機能すること。そして抗生物質耐性遺伝子等を持たないことがある。

## 5.3 作用機序

魚介類を対象に行ったプロバイオティクス効果と思われる細菌に関する研究報告を、次の作用機序毎に分類し、特に仔稚魚・幼生期の魚類、貝類、甲殻類や生物餌料に関して取りまとめた (Table 2)。

### 5.3.1 拮抗

細菌の拮抗作用は、自然界では一般的な現象である。従って、細菌の増殖を阻害する物質を産生する病原細菌と、有害な細菌とのバランスを保つのに拮抗作用は重要な役割を果たしている。拮抗作用は、病原体に負の効果をもたらす。拮抗作用を持つプロバイオティクス菌は、病原性細菌を排除する (Austin *et al.*, 1995; Ruiz-Ponte *et al.*, 1999; Verschuere *et al.*, 2000; Hjelm *et al.*, 2004)。

### 5.3.2 競合的排除

競合的排除は、同じ場所で競合する細菌の増殖を抑制するために確立された細菌の作用工程である。このタイプのプロバイオティクス産物の目的は、接着面、栄養、阻害物質の産生において競合することを基本とし、着実な平衡微生物叢を得ることである (Gil-Turnes *et al.*, 1989; Garriques and Arevalo, 1995; Rico-Mora *et al.*, 1998; Gram *et al.*, 1999; Ottesen and Olafsen, 2000; Li *et al.*, 2006; Gomez-Gil *et al.*, 2002; )。

### 5.3.3 免疫賦活作用

プロバイオティクスは、病原体に対する免疫系への賦活作用の能力を有する物質を産生する。これら免疫系を

賦活化する物質は、グラム陰性細菌 (脂質, 多糖類), グラム陽性細菌 (ペプチドグリカン) と真菌 ( $\beta(1, 3)$ -グルカン) の様な細菌細胞壁から抽出される物質であり、最も実際の投与法は、餌料への添加である (Gildberg and Mikkelsen, 1998; Skjermo and Vadstein, 1999; Rengpipat *et al.*, 2000)。

### 5.3.4 接着

プロバイオティクスのある種の株では、腸管の粘液、上皮細胞や他の組織に接着する能力を持つ。接着する主な目的は、宿主内で細菌が高い効率で行き渡るために重要であり、食べ物が消化管を通して速やかに排泄されるのを防ぐためである。小腸粘膜に接着することで、腸内に留まる時間を長くし、宿主の腸内細菌叢に影響を与えることが出来る (Gildberg *et al.*, 1997; Ringo and Vadstein, 1998; Carnevali *et al.*, 2004)。

### 5.3.5 疾病の防除と制御

プロバイオティクス菌は、病原体の増殖を制御し、有用細菌の増殖を高め、水質改善、魚介類の健康を増進させることに使用されている (Gatesoupe, 1991 b, 1994; Nogami and Maeda, 1992; Vadstein *et al.*, 1993; Maeda, 1994; Nogami *et al.*, 1997; Maeda *et al.*, 1997; Riquelme *et al.*, 1997; Gibson *et al.*, 1998; Riquelme *et al.*, 2001; Orozco-Medina *et al.*, 2002; Gatesoupe, 2002; Villamil *et al.*, 2003; Patra and Mohamed, 2003)。

### 5.3.6 消化過程

魚介類の消化管は開放系であり、常に環境水に接している。消化管は環境水に比べて栄養素に富むため、細菌が増殖しやすい環境である (Avendano and Riquelme, 1999)。腸内細菌は、栄養素の消化や微生物にとって生理活性物質である酵素, アミノ酸, ビタミンの供給に関与する。プロバイオティクスを使用する上で重要な効果としては、魚介類の飼料効率の向上や成長促進がある (Gatesoupe, 1989, 1991 a, b, 1997, 2002; Douillet and Langdon; 1993, 1994; Garriques and Aevalo, 1995; Munro *et al.*, 1995; Skjermo *et al.*, 1997; Rengpipat *et al.*, 1998; Bogut *et al.*, 1998; Hirata *et al.*, 1998; Verschuere *et al.*, 1999; Rombaut *et al.*, 1999; Douillet, 2000; Planas *et al.*, 2004; Venkat *et al.*, 2004)。

### 5.3.7 水質と底質

水質改良に効果があるプロバイオティクス菌は、水質を直接改善し、有機物を消化し、藻類の成長を助長する (Fukami *et al.*, 1992; Suminto and Hirayama, 1996, 1997)。



Table 2 Probiotics considered as biological control agents in seed production of fish, crustaceans, mollusks, and live food

Probiotic strain	Source	Effect	Method of application	Reference
<b>Fish</b>				
<i>Bacillus</i> strain IP5832 spores	—	Increase of weight and decrease of mortality of turbot larvae	Addition to culture water	Gatesoupe (1991a)
<i>Bacillus toyoi</i>	<i>Scophthalmus maximus</i>	Improved turbot larval growth	Addition to culture water	Gatesoupe (1989)
<i>Pediococcus acidilactici</i> and <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Pollack ( <i>Pollachius pollachius</i> )	Improved growth of Pollack larvae	Enrichment of Artemia (in vivo)	Gatesoupe (2002)
<i>Lactobacillus plantarum</i> and <i>Carnobacterium</i> sp.	Rotifers ( <i>Brachionus plicatilis</i> )	Decrease of mortality of turbot larvae	Enrichment of live food	Gatesoupe (1994)
Lyophilized <i>Carnobacterium divergens</i>	Atlantic cod intestines	Decrease of mortality of Atlantic cod fry	Addition to diet	Gildberg et al. (1997)
Lyophilized <i>Carnobacterium divergens</i>	Atlantic salmon intestines	Decrease of mortality of Atlantic cod fry	Addition to diet	Gildberg and Mikkelsen (1998)
Microbially matured water	—	Increase of initial growth rate of turbot and halibut larvae	As culture water	Skjeremo et al. (1997)
Microbiologically matured water	<i>Hippoglossus hippoglossus</i>	Improved survival of yolk-sac larvae	Addition to culture water (?)	Vadstein et al. (1993)
Mixture of <i>Pseudomonas</i> and <i>Cytophaga / Flavobacterium</i>	<i>Hippoglossus hippoglossus</i>	Improved larval survival and immunostimulant treatment	Addition to culture water (?)	Skjeremo and Vadstein (1999)
<i>Lactobacillus fructivorans</i> (AS17B) and <i>L. plantarum</i> (906)	<i>Sparus auratu</i>	Reduced larval mortality	Addition to culture water	Carnevali et al. (2004)
<i>Pseudomonas fluorescens</i> AH2	Iced Lake Victorian Nile perch	Decrease of mortality of rainbow trout juveniles	Addition to culture water and/or bathing in bacterial suspension	Gram et al. (1999)
<i>Roseobacter</i> strain 27-4	<i>Scophthalmus maximus</i>	Improved larval survival	Addition to culture water	Hjelm et al. (2004)
Spray-dried <i>Tetraselmis suecica</i> (unicellular alga)	—	Decrease of mortality of Atlantic salmon juveniles	Addition to diet	Austin et al. (1992)
Strain E ( <i>Vibrio alginolyticus</i> -like)	Healthy turbot larvae	Decrease of mortality and increase of the growth of turbot	Enrichment of rotifers	Gatesoupe (1997)
<i>Streptococcus faecium</i> M74	<i>Cyprinus carpio</i>	Improved growth and food conversion ratio	Addition to diet	Bogut et al. (1998)
<i>Streptococcus thermophilus</i> , <i>Lactobacillus helveticus</i> and <i>Lactobacillus plantarum</i>	<i>Scophthalmus maximus</i>	Increase larval survival of turbot	Enrichment of rotifers	Gatesoupe (1991b)
<i>Vibrio alginolyticus</i>	Commercial shrimp hatchery in Ecuador	Decrease of mortality of Atlantic salmon juveniles	Bathing in bacterial suspension	Austin et al. (1995)
<i>Vibrio pelagius</i>	Copepod-fed turbot larvae	Increase larval survival of turbot	Addition to culture water	RingØ and Vadstein (1998)
<i>Vibrio salmonicida</i> strain	<i>Hippoglossus hippoglossus</i>	Increase of larval survival of Atlantic halibut	Addition to culture water	Ottesen and Olafsen (2000)
VKM-124	<i>Sparus auratu</i>	Reduced infection with various pathogenic viruses	Addition to culture water (?)	Maeda et al. (1997)
<b>Crustaceans</b>				
<i>Bacillus</i> strain S11	<i>Penaeus monodon</i> or mud and water from shrimp ponds	Increase of mean weight and survival of <i>P. monodon</i> larvae and postlarvae	Addition to diet (in vivo)	Rengpipat et al. (1998)
<i>Vibrio alginolyticus</i>	Pacific Ocean seawater	Increase of survival and weight of <i>L. vannamei</i> postlarvae	Addition to culture water	Garriques and Arevalo. (1995)
Strain PM-4	Soil	Increase of survival of <i>P. monodon</i> and <i>P. trituberculatus</i> larvae	Addition to culture water	Maeda (1994)

Table 2 Continued

Probiotic strain	Source	Effect	Method of application	Reference
<i>Lactobacillus sporogenes</i>	Gram negative bacteria	Improved growth rate and feed efficiency ration of postlarvae of F.W. prawns ( <i>Macrobrachium rosenbergii</i> )	In vivo	Venkat et al. (2004)
<i>Bacillus</i> S11	<i>Penaeus monodon</i> (PL-10)	Increase of postlarval survival, and provid cellular and humoral immune defence responses	In vivo	Rengpipat et al. (2000)
VKM-124	<i>Penaeus</i> sp.	Reduce mortality	In vivo	Maeda et al. (1997)
<i>Pseudoalteromonas undina</i> Bacterial strains F3 and PM-4	<i>Portunus trituberculatus</i>	Improved crab larval survival. PM-4 repressed growth of <i>Vibrio</i> spp.	In vivo	Nogami and Maeda (1992)
Alteromonas sp.	<i>Lagenidium callinectes</i> (fungus)	Shrimp embryos	In vivo	Gil-Turnes et al. (1989)
<i>Arthrobacter</i> XE-7	<i>V. parahaemolyticus</i> , <i>V. anguillarum</i> , <i>V. nereis</i>	Shrimp larvae	In vitro and in vivo	Li et al. (2006)
<i>Thalassobacter utilis</i>	<i>V. anguillarum</i> , <i>Haliphthoros</i> sp. (fungus)	Swimming crab larvae	In vivo	Nogami et al. (1997)
<b>Mollusks</b>				
<i>Aeromonas media</i> (strain A199)	<i>A. spp.</i> , <i>V. spp.</i> , <i>P. damsella</i> , <i>Y. ruckeri</i> , <i>V. tubiashii</i> ( <i>Crassostrea gigas</i> )	Decrease of mortality and suppression of the pathogen of Pacific oyster larvae	Addition to culture water (in vitro and in vivo)	Gibson et al. (1998)
<i>Roseobacter</i> sp. BS107	Scallop larval cultures (Variety-including <i>V. spp.</i> , <i>A. spp.</i> )	<i>Pecten maximus</i> (Scallop larvae)	Addition to culture water (in vitro and in vivo)	Ruiz-Ponte et al. (1999)
<i>Vibrio</i> strain 11	Microalgae in a scallop hatchery	Decrease of mortality of scallop larvae	Bathing in bacterial suspension	Riquelme et al. (1997)
Alteromonas. sp. (CA2)	Pacific oyster larvae	Growth and natural survival experiment	In vivo	Douillet and Langdon (1993)
<i>Vibrio</i> sp. 33, <i>Pseudomonas</i> sp. 11 and <i>Bacillus</i> sp. (strain CA2)	<i>Crassostrea gigas</i> (Pacific oyster larvae)	Enhanced growth and natural survival experiment	Addition to culture water (in vivo)	Douillet and Langdon (1994)
Marine bacteria (Strains 11 and C33)	<i>Argopecten purpuratus</i> (Scallop larvae)	Added with microalgae and colonized digestive tract ( <i>V. anguillarum</i> )	Addition to culture water (in vivo)	Avendaño and Riquelme (1999)
<i>Vibrio</i> sp. 33, <i>Pseudomonas</i> sp. 11 and <i>Bacillus</i> sp. (strain B2)	<i>Argopecten purpuratus</i> (Scallop larvae)	Compared with antibiotic treatment, the addition of probiotics increased number of eyed larvae	Natural survival experiment in mass culture(in vivo)	Riquelme et al. (2001)
<b>Live food—Algae</b>				
Several strains	Turbot larvae	Growth stimulation of <i>P. lutheri</i>	Addition to culture water	Munro et al. (1995)
Marine bacteria	Microalgae growth study	<i>Chaetoceros ceratosporum</i>	In vivo	Fukami et al. (1992)
<i>Flavobacterium</i> sp.	Co-culture study	<i>Chaetoceros gracilis</i>	In vivo	Suminto and Hirayama (1996)
7 inhibitory substance-producing marine bacteria	Co-culture study	<i>Isochrysis galbana</i>	In vivo	Avendaño and Riquelme (1999)
Putative <i>A. sp.</i> (SK-05)	<i>Skeletonema costatum</i> culture	Inhibition of the growth of <i>V. alginolyticus</i> in <i>Skeletonema costatum</i> culture	Addition to culture water (in vivo)	Rico-Mora et al. (1998)
<i>Flavobacterium</i> sp.	<i>Chaetoceros gracilis</i> culture (Co-culture study)	Improved growth characteristics of <i>Chaetoceros gracilis</i> , <i>Isochrysis galbana</i> , <i>Pavlova lutheri</i>	Addition to culture water(in vivo)	Suminto and Hirayama (1997)
<i>Vibrio alginolyticus</i> C7b	Seawater(Co-culture study)	<i>Chaetoceros muelleri</i>	Addition to culture water(in vivo)	Gomez-Gil et al. (2002)

Table 2 Continued

Probiotic strain	Source	Effect	Method of application	Reference
<b>Live food—Rotifer</b>				
<i>Lactobacillus plantarum</i>	Turbot growth study	Inhibition of the growth of a fortuitous <i>A. salmonicida</i> strain in rotifer culture	Addition to diet (in vivo)	Gatesoupe (1991b)
Several strains	Rotifer culture	Increase of the specific growth rate of rotifer culture	Addition to culture water	Rombaut et al. (1999)
Mixed culture	Rotifers	Growth experiment	In vivo	Hirata et al. (1998)
<i>Lactococcus lactis</i> AR21	Rotifer culture	Rotifers resistant to <i>V. anguillarum</i>	Addition to culture water (in vivo)	Harzevili et al. (1998)
<i>Alteromonas</i> sp., Gram negative strain	Rotifers	Growth study	In vivo	Douillet (2000a)
Commercial product: 9 commercial products and 8 laboratory cultures (including mainly <i>B. spp.</i> and <i>Ps. spp.</i> )	Rotifers	Natural growth study	In vivo	Douillet (2000b)
7 terrestrial LABs	Rotifers	Growth study	In vivo	Planas et al. (2004)
<b>Live food—Artemia</b>				
<i>A. spp.</i> , <i>V. spp.</i>	Artemia culture	Decrease of mortality of Artemia juveniles	In vivo	Verschuere et al. (2000)
9 marine bacteria	Artemia	Natural survival and growth study	In vivo	Verschuere et al. (1999)
<i>Microbacterium spp.</i> , <i>Exiguobacterium sp.</i>	Artemia	Natural survival study	In vivo	Orozco-Medina et al. (2002)
<i>Saccharomyces boulardii</i> (yeast)	Artemia	<i>V. harveyi</i>	In vivo	Patra and Mohamed (2003)
<i>Pediococcus acidilactici</i>	Artemia	Commercial product	Addition to culture water	Gatesoupe (2002)
<i>Lactobacillus casei</i> , <i>L. brevis</i> , <i>L. helveticus</i> , <i>Lactococcus lactis spp. lactis</i> , <i>Leuconostoc</i> , <i>Mesenteroides spp. mesenteroides</i> , <i>Pediococcus acidilactici</i>	<i>Artemia nauplii</i>	Culture collection ( <i>V. alginolyticus</i> )	Addition to culture water (In vitro and in vivo)	Villamil et al. (2003)

プロバイオティクス細菌を、珪藻を培養している環境で使用する場合には、この単細胞藻類との相互作用に配慮する必要がある。ある細菌は、藻類に対する拮抗作用を示し、単一細胞藻類（バプロバールセリやナンノクロロプシス）の増殖を阻害するため、種苗生産においては注意が必要である。

### 今後の展望

循環濾過式飼育システムに関しては、養殖よりも種苗生産で使用する方が、飼育環境の制御が比較的容易なため、より早期に成果が得られる (Bostock et al., 2010) とする報告もある。RAS技術を北海道における栽培漁業の推進に適用するためには、更なる技術的改良が必要である。本道周辺には既に多くの種苗生産施設が建設され稼働しており、今後種苗生産効率の向上、特に生産コストの低減化を図るために、本システムの実用化が望まれる。

実用化に向けた技術開発の方向性としては、循環濾過式飼育技術のシステム構成を検討し、種苗生産に適した

ものとする必要がある。養殖生産での事例については既にかなり蓄積されているが、種苗生産に関しては、未だ開発途上であり、システム構成のみならず対象種毎の生物学的特性に適合させた技術開発が求められる。しかし、具体的な飼育方法である水温、塩分等の条件や循環濾過水の最適回転率、対象種の発育段階毎の適正な給餌量、飼育管理上重要な水質チェック、底掃除等々についての情報が必須条件である。システム構成等のハード面の情報のみならず、システムを運転する際の情報及び実際の飼育方法に関するソフト面のきめ細かな情報提供があつてこそ、循環濾過式飼育技術の真価が発揮されるであろう。

今後、本技術を種苗生産に適用し、早期に成果を得るためには、やはり異分野の研究者が連携して取り組むことが必要である。例えば、①種苗生産技術の向上（成長適水温・塩分、病原性微生物のバイオコントロール、プロバイオティクスの利用等）、②生物濾過能力の向上（硝化細菌・脱窒細菌等水処理に有効なバクテリアの探索と効率的培養技術の開発等）、③システム工学の適用（生物

濾過機，ゴミ除去機，殺菌装置等々の合理的配置設計等)，④安価な熱源の利活用（温泉，発電所，焼却場，風力や太陽光，海洋深層水，地下水等々）等の課題に対する連携が考えられる（Fig. 1）。

近年種苗生産技術は進展し，いわゆる「ほっとけ飼育」（高橋，1998）という名の飼育管理を極力省力化した方法が提唱されるようになった。これは，仔魚の飼育開始時に生物餌料や生物餌料の餌となる植物性プランクトンを飼育水に添加し，その後は定期的に減少した餌料を補給する程度で，水槽の底掃除をほとんど行わずに取り上げ時まで「ほっとく」飼育方法である。循環濾過式飼育システムに「ほっとけ飼育」の概念やノウハウを適用し，更に餌料培養や水質等のモニタリングと監視を機械化・自動化することで，種苗生産そのものの「自動化」への技術革新が期待される。

#### おわりに

ハタ類等の難種苗生産魚種では，仔魚が水質の急激な変化に弱いいため，種苗生産が困難であった（照屋，2002）。このような魚種にも，循環濾過式飼育システムの活用が考えられる。新しい水をほとんど給水せずに水質を常に良好な状態に保つことが出来るため，環境適応能の低い仔魚期の飼育には好都合な飼育システムと思われる。

一方，種苗生産に使用される採卵用の親魚については，病原体対策として，閉鎖循環式飼育システムを有効活用することで，いわゆる SPF（Specific Pathogen Free）化が可能であろう。魚介類の様々な病原体対策が課題（川合，2007）と成っている現状からして，極めて重要な技術と考えられる。

水産分野における循環濾過飼育に係る水処理技術の発展は，排水処理産業における生物学的な水処理技術の発展に負うところが大きかった様に思われる。排水処理技術は100年以上の歴史があり，その技術開発の一環として生物学的濾過技術が要の技術として発展して来た。濾材に用いられる材質にプラスチックやポリマーが使用されるようになるためには，当該科学技術の進歩に依るところが大きかった。また，技術開発の方向性としては，濾過槽のコンパクト化によるランニングコストの低減化が有り，それに適した浄化細菌の探索が続けられ，アナモックス菌に代表される様な，新たな特性を備えた菌の発見とその実用化への技術開発が続けられている。循環濾過養殖においても，これら排水処理分野における技術を積極的に取り入れ，低コスト化と効率化に向けた技術的改良を進める必要がある。

生物濾過器のメカニカルな仕様のみならず，濾材及びその表面に生成されるバイオフィルムに関する工学的観

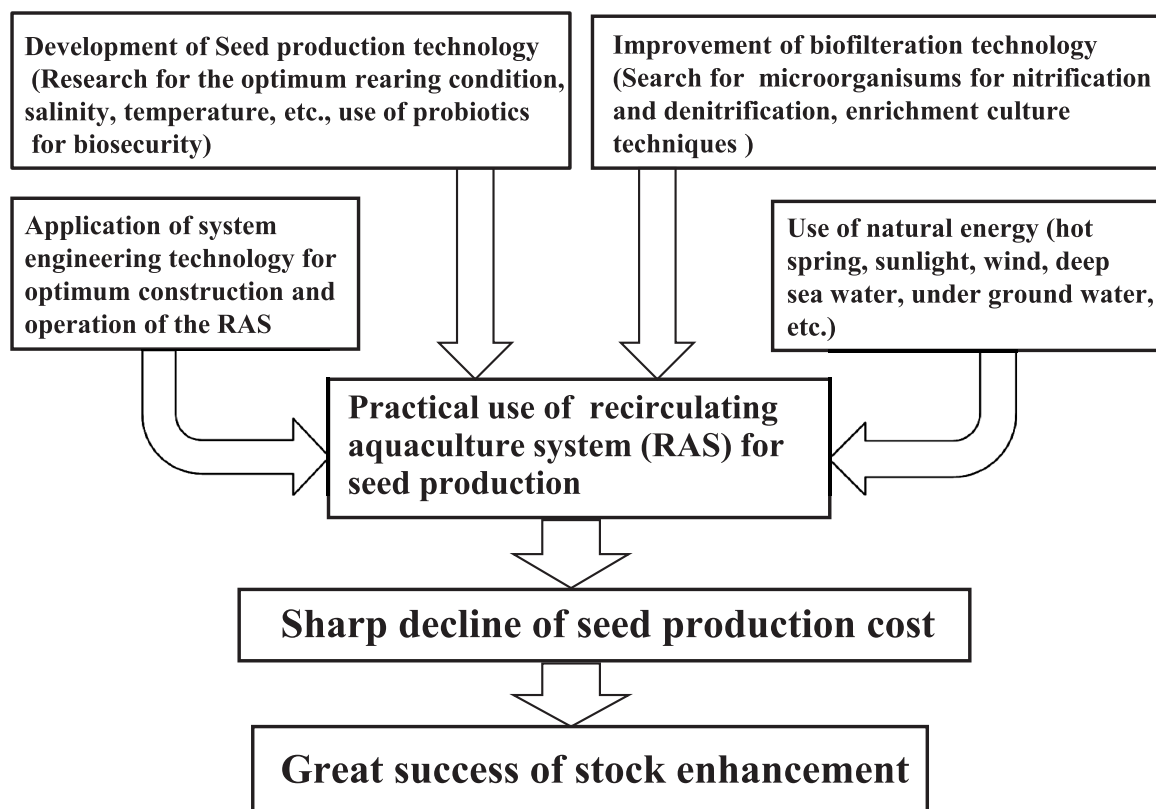


Fig.1 Sharp decline in the cost for seed production from the practical use of RAS.

点からの作用メカニズムと水処理の効率化技術の開発が重要である。下水処理においては、近年水処理技術の進展が著しく、硝化細菌を高分子ゲルの中に固定化した担体を生物反応槽に投入することで、高速で安定した処理が可能となっている。また、次世代型窒素処理技術と注目されているアナモックス菌等の有用細菌の探索が行われており、閉鎖循環飼育における生物濾過技術への応用が期待される場所である。将来的には、水産分野と排水処理工学分野とのコラボも必要であろう。

抗生物質の安易な使用により耐性菌が問題となり、治療よりも予防へと魚病対策の方向性が変わりつつあり、幼稚仔飼育におけるプロバイオティクスが重要性を増している。発育の初期段階において、稚仔の腸内細菌を操作するため、プロバイオティクスを飼育水に添加、あるいは生物餌料を介して投与することが可能である。プロバイオティクスを利用した飼育環境のコントロールは、免疫機能の未発達な仔魚・幼生期には特に有効である。微生物（プロバイオティクス菌及び水質浄化細菌等）の動態をリアルタイムでモニタリングする機器（次世代シーケンサーの進化形等）を開発することで、飼育水を常に最適な状況に維持するシステムの構築が望まれる。種苗生産現場において実用可能な微生物製剤の有効性、安全性を確かめつつ、作用メカニズムに関する科学的、実証的データを蓄積していくことで、環境に優しい21世紀型の新規プロバイオティクスの創成が期待される。プロバイオティクス菌の探索のみならず、作用機序を解明するためにも、基礎と応用を繋ぐ連携が不可欠であり、水産学以外の分野、例えば医学、獣医学、分子生物学等の研究者と協力・連携した取り組みも望まれる。

## 文 献

- Abell GC, Revill AT, Smith C, Bissett AP, Volkman JK, Robert SS. Archaeal ammonia oxidizers and nirS-type denitrifiers dominate sediment nitrifying and denitrifying populations in a subtropical macrotidal estuary. *ISME J.* 2010; 4: 286–300.
- Achuthan C, Kumar VJR, Manju NJ, Philip R, Singh ISB. Development of nitrifying bacteria for immobilizing in nitrifying bioreactors designed for penaeid and non-penaeid larval rearing systems in the tropics. *Indian J. Mar. Sci.* 2006; 35: 240–248.
- Agogue H, Brink M, Dinasquet J, Herndl GJ. Major gradients in putatively nitrifying and non-nitrifying Archaea in the deep North Atlantic. *Nature* 2008; 456: 788–791.
- Aguirre-Guzmán G, Lara-Flores M, Sánchez-Martínez JG, Campa-Córdova AI, Luna-González A. The use of probiotics in aquatic organisms: a review. *Afr. J. Microbiol. Res.* 2012; 6: 4845–4857.
- Arunachalam S, Ravichandradev S. Food intake, growth, food conversion and body composition of catfish exposed to different salinities. *Aquaculture* 1979; 16: 163–171.
- Attramadal JK, Vadsteins O, Olsen Y, Oie G. Recirculation: Microbial control strategy for intensive marine larviculture. *Global Aquaculture Advocate* 2010 August; 65–67.
- Attramadal JK, Salvesen I, Xue R, Oie G, Storseth RT, Vadstein O, Olsen Y. Recirculation as a possible microbial control strategy in the production of marine larvae. *Aquacultural Engineering* 2012; 46: 27–39.
- Austin B, Stuckey LF, Robertson PAW, Effendi I, Griffith DRW. A probiotic strain of *Vibrio alginolyticus* effective in reducing diseases caused by *Aeromonas salmonicida*, *Vibrio anguillarum* and *Vibrio ordalii*. *J. Fish Dis.* 1995; 18:93–96.
- Avendaño RE, Riquelme CE. Establishment of mixed probiotics and microalgae as food for bivalve larvae. *Aquaculture Research* 1999; 30: 893–900.
- Balcázar JL, de Blas I, Ruiz-Zazuela I, Cunningham D, Vandrell D, Muzquiz JL. The role of probiotics in aquaculture. *Vet. Microbiol.* 2006; 114: 173–186.
- Beman JM, Popp BN, Francis CA. Molecular and biogeochemical evidence for ammonia oxidation by marine Crenarchaeota in the Gulf of California. *ISME J.* 2008; 2: 429–441.
- Bentley CD, Carroll PM, Riedel AM, Watanabe WO. Pilot-scale recirculating rotifer culture system uses condensed microalgae. *Global Aquaculture Advocate*, August 2005; 54–55.
- Biddle JF, Fitz-Gibbon S, Schuster SC, Brenchley JE, C. H. House CH. Metagenomic signatures of the Peru Margin subseafloor biosphere show a genetically distinct environment. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2008; 105 : 10583–10588.
- Bogut I, Milakovic Z, Bukvic Z, Brkic S, Zimmer R. Influence of probiotic (*Streptococcus faecium* M74) on growth and content of intestinal microflora in carp (*Cyprinus carpio*). *Czech J Anim Sci* 1998; 43: 231–235.
- Bostock J, McAndrew B, Richards R, Jauncey K, Telfer T, Lorenzen K, Little D, Ross L, Handisyde N, Gatward I, Corner R. Aquaculture: global status and trends (Review). *Phil. Trans. R. Soc. B.* 2010; 365: 2897–2912.

- Braker G, Fesefeldt A, Wittzel KP. Development of PCR primer systems for amplification of nitrite reductase genes (*nirK* and *nirS*) to detect denitrifying bacteria in environmental samples. *Appl. Environ. Microbiol.* 1998; 64: 111–127.
- Braker G, Zhou J, Wu, L, Devol AH, Tiedje JM. Nitrite reductase genes (*nirK* and *nirS*) as functional markers to investigate diversity of denitrifying bacteria in Pacific Northwest marine sediment communities. *Appl. Environ. Microbiol.* 2000; 66: 2096–2104.
- Canagaratnam P. Growth of fishes in different salinities. *J. Fish. Res. Board Can.* 1959; 16(1): 121–130.
- Carnevali O, Zamponi MC, Sulpizio R, Rollo A, Nardi M, Orpianesi C, Silvi S, Caggiano M, Polzonetti AM, Cresci A. Administration of a probiotic strain to improve sea bream wellness during development. *Aquaculture Int* 2004; 12: 377–386.
- Chen AHC, Dosoretz CG, Grethlein HE. Ligninase production by immobilized cultures of *Phanerochaete chrysosporium* grown under nitrogen sufficient conditions. *Enzyme Microbiol. Technol.* 1991; 13: 404–407.
- Dalsgaard T, Canfield DE, Petersen J, Thamdrup B, Acuna-Gonzalez J. N<sub>2</sub> production by the anammox reaction in the anoxic water column of Golfo Dulce, Costa Rica. *Nature* 2003; 422: 606–608.
- Dapena-Mora A, Campos JL, Mosquera-Corral A, Jetten MSM, Mendez R. Stability of the ANAMMOX process in a gas-lift reactor and a SBR. *J. Biotechnol.* 2004; 110: 159–170.
- Delbos B, Schwarz MH. Rotifer production (as a first feed item) for intensive finfish larviculture. Virginia Cooperative Extension, Publication 600–105, www. Ext. vt. Edu. 2009.
- DeLong EF. Archaea in coastal marine environments. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1992; 89: 5685–5689.
- DeLong EF. Everything in moderation: archaea as ‘non-extremophiles’. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 1998; 8(6): 649–654.
- DeLong EF, Pace NR. Environmental diversity of bacteria and archaea. *Syst. Biol.* 2001; 50: 470–478.
- Dhanasiri AKS, Kiron V, Fernanders JMO, Bergh O, Powell MD. Novel application of nitrifying bacterial consortia to ease ammonia toxicity in ornamental fish transport units: trials with zebrafish. *J. Appl. Microbiol.* 2011; 111: 278–292.
- Douillet P, Langdon CJ. Effects of marine bacteria on the culture of axenic oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg) larvae. *The Biological Bulletin* 1993; 184, 36–51.
- Douillet PA, Langdon CJ. Use of a probiotic for the culture of larvae of the Pacific oyster (*Crassostrea gigas* Thunberg). *Aquaculture* 1994; 119: 25–40.
- Douillet PA. Bacterial additives that consistently enhance rotifer growth under synxenic culture conditions 1. Evaluation of commercial products and pure isolates. *Aquaculture* 2000a; 182: 249–260.
- Douillet PA. Bacterial additives that consistently enhance rotifer growth under synxenic culture conditions 2. Use of single and multiple bacterial probiotics. *Aquaculture* 2000b; 182: 241–248.
- Egli K, Bosshard F, Werlen C, Lais P, Siegrist H, Zehnder AJ, Van der Meer JR. Microbial composition and structure of a rotating biological contactor biofilm treating ammonium-rich wastewater without organic carbon. *Microb. Ecol.* 2003; 45: 419–432.
- 江森弘祥, 中村裕紀, 竹島 正, 田中和博, 中西 弘. 包括固定化微生物を用いた窒素除去リアクターの開発. 土木学会論文集 1995; No.515/II-31: 115–126.
- 遠藤雅人. 内陸での海産魚養殖を実現する閉鎖循環式養殖システム. 楽水だより 2012; No.839.
- Farzanfar A. The use of probiotics in shrimp aquaculture. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 2006; 48: 149–158.
- Francis CA, Beman JM, Kuypers MM. New processes and players in the nitrogen cycle: the microbial in marine ecology of anaerobic and archaeal ammonia oxidation. *ISME J.* 2007; 1(1): 19–27.
- Francis CA, Boberts KJ, Beman JM, Santoro AE, Oakley BB. Ubiquity and diversity of ammonia-oxidizing archaea in water columns and sediments of the ocean. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2005; 102: 14683–14688.
- Fu Y, Hada A, Yamashita T, Yoshida Y, Hino A. Development of a continuous culture system for stable mass production of the marine rotifer *Brachionus*. *Hydrobiologia* 1997; 358: 145–151.
- Fuhrman, JA, McCallum K, Davis AA. Novel major archaeobacterial group from marine plankton. *Nature* 1992; 356: 148–149.
- Fukami K, Nishijima T, Hata Y. Availability of deep seawater and effects of bacteria isolated from deep seawater on the mass culture of food microalga *Chaetoceros ceratosporum*. *Nippon Suisan Gakkaishi* 1992; 58(5): 931–936.
- Fuller R. Probiotics in man and animals, a review. *J. Appl.*

- Bacteriol.* 1989; 66: 365–378.
- 福所邦彦, 平山和次. 「初期餌料生物—シオミズツボウムシ (福所邦彦, 平山和次編)」, 恒星社厚生閣, 東京. 1989 ; 1–240.
- Gao Y, Liu Z, Liu F, Furukawa K. Mechanical shear contributes to granule formation resulting in quick start-up and stability of a hybrid anammox reactor. *Biodegradation* 2012; 23(3): 363–372.
- Garriques D, Arevalo G. An evaluation of the production and use of a live bacterial isolate to manipulate the microbial flora in the commercial production of *Penaeus vannamei* postlarvae in Ecuador, p. 53–59. In C. L. Browdy and J. S. Hopkins (ed.), Swimming through troubled water. Proceedings of the Special Session on Shrimp Farming, Aquaculture'95. World Aquaculture Society, Baton Rouge, La. 1995.
- Gatesoupe FJ. Further advances in the nutritional and antibacterial treatments of rotifers as food for turbot larvae, *Scophthalmus maximus*. *Aquaculture – A Biotechnology in Progress* (de Pauw N, ed), pp. 721–730. European Aquaculture Society, Bredene. 1989.
- Gatesoupe FJ. Bacillus sp. spores as food additive for the rotifer *Brachionus plicatilis*: improvement of their bacterial environment and their dietary value for larval turbot, *Scophthalmus maximus* L., p. 561–568. In S. Kaushik (ed.), Fish nutrition in practice. Proceedings of the 4th International Symposium on Fish Nutrition and Feeding. Institut National de la Recherche Agronomique, Paris, France. 1991a.
- Gatesoupe FJ. The effect of three strains of lactic bacteria on the production rate of rotifers, *Brachionus plicatilis*, and their dietary value for larval turbot, *Scophthalmus maximus*. *Aquaculture* 1991b; 96: 335–342.
- Gatesoupe FJ. Lactic acid bacteria increase the resistance of turbot larvae, *Scophthalmus maximus*, against pathogenic vibrio. *Aquatic Liv Resour* 1994; 7: 277–282.
- Gatesoupe FJ. Sidephore production and probiotic effect of *Vibrio* sp. associated with turbot larvae, *Scophthalmus maximus*. *Aquatic Liv Resour* 1997; 10: 239–246.
- Gatesoupe FJ. The use of probiotics in aquaculture. *Aquaculture* 1999; 180: 147–165.
- Gatesoupe FJ. Probiotic and formaldehyde treatments of *Artemia nauplii* as food for larval pollack, *Pollachius pollachius*. *Aquaculture* 2002; 212: 347–360.
- Gibson LF, Woodworth J, George AM. Probiotic activity of *Aeromonas media* on the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, when challenged with *Vibrio tubiashii*. *Aquaculture* 1998; 169: 111–120.
- Gildberg A, Mikkelsen H, Sandaker E, Ringø E. Probiotic effect of lactic acid bacteria in the feed on growth and survival of fry of Atlantic cod (*Gadus morhua*). *Hydrobiologia* 1997; 352: 279–285.
- Gildberg A, Mikkelsen H. Effects of supplementing the feed of Atlantic cod (*Gadus morhua*) fry with lactic acid bacteria and immunostimulating peptides during a challenge trial with *Vibrio anguillarum*. *Aquaculture* 1998; 167: 103–113.
- Gil-Turnes MS, Hay ME, Fenical W. 1989. Symbiotic marine bacteria chemically defend crustacean embryos from pathogenic fungus. *Science* 1989; 246: 116–118.
- Gomez-Gil B, Roque A, Turnbull JF. The use and selection of probiotic bacteria for use in the culture of larval aquatic organisms. *Aquaculture* 2000; 191: 259–270.
- Gomez-Gil B, Roque A, Velasco-Blanco G. Culture of *Vibrio alginolyticus* C7b, a potential probiotic bacterium, with the microalga *Chaetoceros muelleri*. *Aquaculture* 2002; 211: 43–48.
- Gram L, Melchiorson J, Spanggaard B, Huber I, Nielsen T. Inhibition of *Vibrio anguillarum* by *Pseudomonas fluorescens* strain AH2—possible probiotic treatment of fish. *Appl. Environ. Microbiol.* 1999; 65(3): 969–973.
- Gruntzig V, Nold SC, Zhou J, Tiedje JM. *Pseudomonas stutzeri* nitrite reductase gene abundance in environmental samples measured by real-time PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* 2001; 47: 760–768.
- Hallam SJ, Mincer TJ, Schleper C, Preston CM, Roberts K, Richardson PM, E. F. DeLong EF. Pathways of carbon assimilation and ammonia oxidation suggested by environmental genomic analyses of marine Crenarchaeota. *PLoS Biol.* 2006; 4: e95.
- Hashimoto S, Furukawa K, Hana H. Fundamental study on immobilization of activated sludge and its characterization of biodegradation. *Gesuidokyoukaishi* 1986; 23: 16–22.
- 橋本 奨. バイオテクノロジー活用の高機能型活性汚泥法. 技報堂出版. 東京, 1989 ; 52–65.
- Hino A, Aoki S, Ushiro M. Nitrogen-flow in the rotifer *Brachionus plicatilis* and its significance in mass culture. *Hydrobiologia* 1997; 358: 77–82.
- Hirata H, Murata O, Yamada S, Ishitani H, Wachi M. Probiotic culture of the rotifer *Brachionus plicatilis*. *Hydrobiologia* 1998; 387/388: 495–498.
- Hjelm M, Bergh Ø, Riaza A, Nielsen J, Melchiorson J, Jensen

- S, Duncan H, Ahrens P, Birkbeck H, Gram L. Selection and identification of autochthonous potential probiotic bacteria from turbot larvae (*Scophthalmus maximus*) rearing units. *System. Appl. Microbiol.* 2004; 27: 360–371.
- Hsia T-H, Feng Y-J, Ho C-M, Chou W-P, Tseng S-K. PVA-alginate immobilized cells for anaerobic ammonium oxidation (anammox) process. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 2008; 35: 721–727.
- Hu B-L, Shen L-D, Xu X-Y, Zheng P. Anaerobic ammonium oxidation (anammox) in different natural ecosystems. *Biochem. Soc. Trans.* 2011; 39: 1811–1816.
- 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. 閉鎖循環濾過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* 2010; 58(3): 373–380.
- 伊藤 隆. 伊勢湾西岸養鰻池の塩分とプランクトン動物相. *三重県立大学研報* 1957; 2: 473–501.
- 伊藤 隆. 輪虫の海水培養と保存について. *三重県立大学水産学部紀要* 1960; 3(3): 708–740.
- Irianto A, Austin B. Probiotics in aquaculture. *J. Fish Dis.* 2002; 25: 633–642.
- Isaka K, Date Y, Kimura Y, Sumito T, Tsuneda S. Nitrogen removal performance using anaerobic ammonium oxidation at low temperatures. *FEMS Microbiol. Lett.* 2007; 282: 32–38.
- Jae-Koan, S, Jung H, Kim MR, Kim BJ, Nam SW, Kim SK. Nitrification performance of nitrifiers immobilized in PVA (polyvinyl alcohol) for a marine recirculating aquarium system. *Aquacultural Engineering* 2001; 24: 181–194.
- Jianlong W, Jing K. The characteristics of anaerobic ammonium oxidation (ANAMMOX) by granular sludge from an EGSB reactor. *Process Biochem.* 2005; 40: 1973–1978.
- Jung M-Y, Park S-J, Min D, Kim J-S, Rijpstra WIC, Damste JSS, Kim G-J, Madsen EL, Rhee S-K. Enrichment and characterization of an autotrophic ammonia-oxidizing archaeon of mesophilic crenarchaeal group I.1a from an agricultural soil. *Appl. Environ. Microbiol.* 2011; 77: 8635–8647.
- 鴨志田正晃. 「栽培漁業におけるコスト削減の考え方」. 平成20年度栽培漁業ブロック会議資料. 独)水産総合研究センター. 2008.
- Kawagoshi Y, Nakamura Y, Kawashima H, Fujisaki K, Fujimoto A, Furukawa K. Enrichment culture of marine ammonium oxidation (anammox) bacteria from sediment of sea-based waste disposal site. *J. Bioscience Bioengineering* 2009; 107(1): 61–63.
- Kawagoshi Y, Nakamura Y, Kawashima K, Fujisaki K, Furukawa K, Fujimoto A. Enrichment of marine anammox bacteria from seawater-related samples and bacteria community study. *Water Science & Technology* 2010; 61(1): 2010.
- 川合研児. 魚病原因微生物とその防除の考え方. 「微生物の利用と制御—食の安全から環境保全まで. 水産学シリーズ (日本水産学会監修. 藤井建夫, 杉田治男, 左子芳彦編)」恒星社厚生閣, 東京. 2007; 46–56.
- Kayee P, Sonthiphand P, Rongsayamanont C, Limpiyakon T. Archaeal *amoA* genes outnumber bacterial *amoA* genes in municipal wastewater treatment plants in Bangkok. *Microb. Ecol.* 2011; 62(4): 776–788.
- Kesarcodi-Watson A, Kaspar H, Lategan MJ, Gibson L. Probiotics in aquaculture: the need, principles and mechanisms of action and screening processes. *Aquaculture* 2008; 274: 1–14.
- 北田修一. 栽培漁業の成功条件と生物学的問題点. 栽培漁業を考える (第5回). アクアネット, 東京. 1998; 11: 42–44.
- 木村裕哉, 井坂和一. アナモックス反応による窒素排水処理技術の適用拡大. 日立プラントテクノロジー技報, 2013; No.7.
- Konneke M, Bernhard AE, de la Torre JR, Walker CB, Waterbury JB, Stahl DA. Isolation of an autotrophic ammonia-oxidizing marine archaeon. *Nature* 2005; 437: 543–546.
- Kumar VJR, Achuthan C, Manju NJ, Philip R, Singh ISB. Stringed bed suspended bioreactors (SBSBR) for in situ nitrification in penacid and non-penacid hatchery systems. *Aquacult. Int.* 2009; 17: 479–489.
- Kuypers MM, Slijkens AO, Lavik G, Schmid M, Jorgensen BB, Kuenen JG, Damste JSS, Strous M, Jetten MSM. Anaerobic ammonium oxidation by anammox bacteria in the Black Sea. *Nature* 2003; 422: 608–611.
- Kuypers MM, Lavik G, Woebken D, Schmid M, B. M. Fuchs BM, Amann R, Jorgensen BB, Jetten MS. Massive nitrogen loss from the Benguela upwelling system through anaerobic ammonium oxidation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2005; 102: 6478–6483.
- 桑田 博. 現在普及している培養法. 「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, 東京. 2000a ; 48-80.
- 桑田 博. 粗放連続培養. 「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, 東京. 2000b ; 92-107.
- Lahav O, Massada IB, Yackoubov D, Zelikson R, Mozes N, Tal Y, Tarre S. Quantification of anammox activity in a denitrification reactor for a recirculating aquaculture system. *Aquaculture* 2009; 288: 76-82.
- Lall SP, Bishop FJ. 海水中及び淡水中で育てたニジマス (*Salmo gairdneri*) の栄養要求に関する研究 FAO水産増養殖国際会議論文集 II, 水産庁. 1976 ; 113-119.
- Lee CS, Ostrowski AC. Current status of marine finfish larviculture in the United States. *Aquaculture* 2001; 200: 89-109.
- Leininger S, Urich T, Schloter M, Schwark L, Qi J, Nicol GW, Prosser JI, Schuster SC, Schleper C. Archaea predominate among ammonia-oxidizing prokaryotes in soils. *Nature* 2006; 442: 806.
- Li J, Tan B, Mai K, Ai Q, Zhang W, Xu W, Liufu Z, Ma H. Comparative study between probiotic bacterium *Arthrobacter* XE-7 and chloramphenicol on protection of *Penaeus chinensis* post-larvae from pathogenic vibrios. *Aquaculture* 2006; 253: 140-147.
- Lilley DM, Stillwell RJ. Probiotics: growth promoting factors produced by microorganisms. *Science* 1965; 147: 747-748.
- Limpiyakorn T, Furrhacker M, Haberl R, Chodanon T, Srithip P, Sonthiphand P. *amoA*-encoding archaea wastewater treatment plants: a review. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2013; 97(4): 1425-1439.
- Lopez H, Puig S, Ganique R, Rusalleda M, Balaguer MD, Colprim J. Start-up and enrichment of a granular anammox SBR to treat high nitrogen load wastewaters. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 2008; 83: 233-241.
- Lopez-Garcia P, Lopez-Lopez A, Moreira D, Rodriguez-Valera F. Diversity of free-living prokaryotes from a deep-sea at the the Antarctic Polar Front. *FEMS Microbiol. Ecol.* 2001; 36: 193-202.
- Lund MB, Smith JM, Francis CA. Diversity, abundance and expression of nitrite reductase (*nirK*)-like genes in marine thaumarchaea. *ISME J.* 2012; 6: 1966-1977.
- Maeda M. Biocontrol of the larvae rearing biotope in aquaculture. *Bull. Natl. Res. Inst. Aquacult.* 1994; 1: 71-74.
- Maeda M, Nogami K, Kanematsu M, Hirayama K. The concept of biological control methods in aquaculture. *Hydrobiologia* 1997; 358: 285-290.
- 社)マリノフォーラム21種苗生産システム研究会. 平成11年度閉鎖循環飼育循環式陸上養殖システムの開発(環境創出型養殖技術)に関する報告書. 東京. 2000 ; 1-248.
- Merrifield DL, Dimitroglou A, Foey A, Davies SJ, Baker RTM, Bøggwald J, Castex M, Ringø E. The current status and future focus of probiotic and prebiotic applications for salmonids. *Aquaculture* 2010; 302: 1-18.
- Meyer RL, Risgaard-Petersen N, Allen DE. Correlation between anammox activity and microscale distribution of nitrite in a subtropical mangrove sediment. *Appl. Environ. Microbiol.* 2005; 71: 6142-6149.
- Mincer TJ, Church MJ, Taylor LT, Preston C, D. M. Karl DM, DeLong EF, Quantitative distribution of presumptive archaeal and bacterial nitrifiers in Monterey Bay and the North Pacific Subtropical Gyre. *Environ. Microbiol.* 2007; 9: 1162-1175.
- 宮崎 徹, 中原啓介. 新環境社会を創造する商品と技術. NKK技報. 2002 ; No.179 : 98-103.
- Mohapatra S, Chakraborty T, Kumar V, Deboeck G, Mohanta KN. Aquaculture and stress management: a review of probiotic intervention. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.* 2013; 79: 405-430.
- 森実康男, 高橋紹典, 市川 衛. 50%海水によるカサゴ仔魚の飼育. 栽培技研 1983 ; 12 : 11-18.
- 森田哲男. 「閉鎖循環飼育システム」を用いた海産魚類の種苗生産への適用. 平成23年度栽培漁業技術研修会テキスト集 ー省力化・省エネ化・低コスト化に役立つ増養殖技術ー. (社)全国豊かな海づくり推進協会. 2011 ; 1-16.
- Mudler A, van de Graaf AA, Robertson LA, Kuenen JG. Anaerobic ammonium oxidation discovered in a denitrifying fluidized bed reactor. *FEMS Microbiol. Ecol.* 1995; 16: 177-184.
- Munro PD, Barbour A, Birkbeck TH. Comparison of the growth and survival of larval turbot in the absence of culturable bacteria with those in the presence of *Vibrio anguillarum*, *Vibrio alginolyticus*, or a marine *Aeromonas* sp. *Appl. Environ. Microbiol.* 1995; 61: 4425-4428.
- Nagadomi H, Hiromitsu T, Takeno K, Watanabe M, Sasaki K. Treatment of aquarium water by denitrifying photosynthetic bacteria using immobilized polyvinyl alcohol beads. *J. Biosci. Bioeng.* 1999; 87: 189-193.
- Nakajima J, Sakka M, Kimura T, Furukawa K, Sakka K. Enrichment of anammox bacteria from marine environment

- for the construction of a bioremediation reactor. *Environ. Biol.* 2008; 77: 1159–1166.
- Nayak SK. 2010. Probiotics and immunity: a fish perspectives. *Fish Shellfish Immunol.* 2010; 29: 2–14.
- Ni S-Q, Lee P-H, Fessenhaie A, Gao B-Y, Sung S. Enrichment and biofilm formation of anammox bacteria in a non-woven membrane reactor. *Bioresource Technology* 2010; 101(6): 1792–1799.
- Nicol GW, Schleper C. Ammonia-oxidising Crenarchaeota: important players in the nitrogen cycle? *Trends in Microbiology* 2006; 14: 207–212.
- Nilson I, Ohlson S, Haggstrom L, Molin N, Mosbach K. Denitrification of water using immobilized *Pseudomonas denitrificans* cells. *Eur. J. Appl. Microbiol.* 1980; 10: 261–274.
- Ninawe AS, Selvin J. Probiotics in shrimp aquaculture: avenues and challenges. *Crit. Rev. Microbiol.* 2009; 35: 43–66.
- Nogami K, Maeda M. Bacteria as biocontrol agents for rearing larvae of the crab *Portunus trituberculatus*. *Can J Fish Aquatic Sci* 1992; 49: 2373–2376.
- Nogami K, Hamasaki K, Maeda M, Hirayama K. Biocontrol method in aquaculture for rearing the swimming crab larvae *Portunus trituberculatus*. *Hydrobiologia* 1997; 358: 291–295.
- Ochsenreiter T, Selezi D, Quaiser A, Bonch-Osmolovskaya L, Schleper C. Diversity and abundance of Crenarchaeota in terrestrial habitats studied by 16S RNA surveys and real time PCR. *Environ. Microbiol.* 2003; 5: 787.
- 御堂岡あにせ, 飯田悦左. 希釈海水処理によるオニオコゼ仔魚の斃死軽減方法. 広島水技センター研報 2006 ; 1 : 41–42.
- 御堂岡あにせ. 「閉鎖循環飼育システム」を活用した低塩分海水によるカサゴ種苗生産. 平成23年度栽培漁業技術研修会テキスト集 一省力化・省エネ化・低コスト化に役立つ増養殖技術一. (社)全国豊かな海づくり推進協会. 2011 ; 1 ~ 8.
- Orozco-Medina C, Maeda-Martínez M, López-Cortés A. 2002. Effect of aerobic Gram-positive heterotrophic bacteria associated with *Artemia franciscana* cysts on the survival and development of its larvae. *Aquaculture* 2002; 213: 15–29.
- Ottesen OH, Olafsen JA. Effects on survival and mucous cell proliferation of Atlantic halibut, *Hippoglossus hippoglossus* L, larvae following microflora manipulation. *Aquaculture* 2000; 187: 225–238.
- Park EJ, Seo JK, Kim MR, Jung IH, Kim JY, Kim SK. Salinity acclimation of immobilized freshwater denitrifiers. *Aquacultural Engineering* 2001; 24: 169–180.
- Park H-D, Wells GF, Bae H, Criddle CS, Francis CA. Occurrence of ammonia-oxidizing Archaea in wastewater treatment plant bioreactors. *Appl. Environ. Microbiol.* 2006; 72: 5643–5647.
- Parker RB. Probiotics, the other half of the antimicrobial story. *Anim. Nutr. Health* 1974; 29: 4–8.
- Patra, SK, Mohamed KS. Enrichment of *Artemia* nauplii with the probiotic yeast *Saccharomyces boulardii* and its resistance against a pathogenic *Vibrio*. *Aquaculture International* 2003; 11: 505–514.
- Pathak BK, Kazama F, Tanaka Y, Mori K, Sumino T. Quantification of anammox populations enriched in an immobilized microbial consortium with low levels of ammonium nitrogen and at low temperature. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2007; 76: 1173–1179.
- Penton CR, Devol AH, Tiedje JM. Molecular evidence for the broad distribution of anaerobic ammonium-oxidizing bacteria in freshwater and marine sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* 2006; 72(10): 6829–6832.
- Planas M, Vázquez JA, Marqués J, Pérez-Lomba R, González MP, Murado M. 2004. Enhancement of rotifer (*Branchionus plicatilis*) growth by using terrestrial lactic acid bacteria. *Aquaculture* 2004; 240: 313–329.
- Prado S, Romalde JL, Barja JL. Review of probiotics for use in bivalve hatcheries. *Vet. Microbiol.* 2010; 145: 187–197.
- Prieme A, Braker G, Tiedje JM. Diversity of nitrite reductase (*nirK* and *nirS*) gene fragments in forested upland and wetland soils. *Appl. Environ. Microbiol.* 2002; 68: 1893–1900.
- Rengpipat S, Phianphak W, Piyatiratitivorakul S, Menasveta P. Effects of a probiotic bacterium on black tiger shrimp *Penaeus monodon* survival and growth. *Aquaculture* 1998; 167: 301–313.
- Rengpipat S, Rukpratanporn S, Piyatiratitivorakul S, Menasveta P. Immunity enhancement in black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) by a probiont bacterium (*Bacillus* S11). *Aquaculture* 2000; 191: 271–288.
- Riche MA, Pfeiffer TJ, Wills PS, Amberg JJ, Sepulveda MS. Inland marine fish culture in low salinity recirculating aquaculture systems. *Bull. Fish. Res. Agen.* 2012; 35: 65–75.
- Rico-Mora R, Voltolina D, Villaescusa-Celaya JA. Biological

- control of *Vibrio alginolyticus* in *Skeletonema costatum* (Bacillariophyceae) cultures. *Aquacultural Engineering* 1998; 19: 1–6.
- RingØ E, Vadstein O. Colonization of *Vibrio pelagius* and *Aeromonas caviae* in early developing turbot (*Scophthalmus maximus* L.) larvae. *J Appl Microbiol* 1998; 84: 227–233.
- Riquelme C, Araya R, Vergara N, Rojas A, Guaita M, Candia M. Potential probiotic strains in the culture of the Chilean scallop *Argopecten purpuratus* (Lamarck, 1819). *Aquaculture* 1997; 154: 17–26.
- Riquelme CE, Jorquera MA, Rojas AI, Avendaño RE, Reyes N. Addition of inhibitor-producing bacteria to mass cultures of *Argopecten purpuratus* larvae (Lamarck, 1819). *Aquaculture* 2001; 192: 111–119.
- Rombaut G, Dhert P, Vandenberghe J, Verschuere L, Sorgeloos P, Verstraete W. 1999. Selection of bacteria enhancing the growth rate of axenically hatched rotifers (*Brachionus plicatilis*). *Aquaculture* 1999; 176: 195–207.
- Ruiz-Ponte C, Samain JF, Sa´nchez JL, Nicolas JL. 1999. The benefit of a *Roseobacter* species on the survival of scallop larvae. *Mar. Biotechnol.* 1999; 1: 52–59.
- 齊藤節雄, 佐々木睦子, 李海鷗, 清水幹博, 山田寿郎. ヒラメ稚魚の成長と代謝に及ぼす低塩分環境の影響. 北水試研報 1990; 34: 1–8.
- Sananurak C, Lirdwitayaprasit T, Menasveta P. Development of a closed-recirculating, continuous culture system for microalga (*Tetraselmis suecica*) and rotifer (*Brachionus plicatilis*) production. *Science Asia* 2009; 35: 118–124.
- Santoro A, Casciotti KL. Enrichment and characterization of ammonia-oxidizing archaea from the open ocean: phylogeny, physiology and stable isotope fractionation. *The ISME Journal* 2011; 5: 1796–1808.
- 早乙女浩一. 栽培漁業の現状と課題. 日本水産学会誌 2009; 75(1): 131–137
- Schmidt I, Sliemers O, Schmidt M, Bock E, Fuerst J, Kuenen JG, Jetten MSM, Strous M. New concepts of microbial treatment processes for the nitrogen removal in wastewater. *FEMS Microbiol. Rev.* 2003; 27: 481–492.
- 千畑一郎. 「固定化酵素 (千畑一郎編)」講談社サイエンスティフィク, 東京. 1975; 305 pp.
- Seo JK, Jung IH, Kim MR, Kim BJ, Nam SW, Kim SK. Nitrification performance of nitrifiers immobilized in PVA (polyvinyl alcohol) for a marine recirculating aquarium system. *Aquacultural Engineering* 2001; 26: 191–203.
- Shen L-D, Hu A-H, Jin R-C, Cheng D-Q, Zheng P, Xu X-Y, Hu B-I. Enrichment of anammox bacteria from three sludge sources for the startup of monosodium glutamate industrial wastewater treatment system. *J. Hazard. Mater.* 2012; 199: 193–199.
- Skjermo J, Salvesen I, G. Oie G, Olsen Y, Vadstein O. Microbially matured water: a technique for selection of a non-opportunistic bacterial flora in water that may improve performance of marine larvae. *Aquacult. Int.* 1997; 5: 13–28.
- Skjermo J, Vadstein O. Techniques for microbial control in the intensive rearing of marine larvae. *Aquaculture* 1999; 177: 333–343.
- Strous M, Gerven EV, Kuenen JG, Jetten MS. Effects of aerobic and microaerobic conditions on anaerobic ammonium-oxidizing (Anammox) sludge. *Appl. Environ. Microbiol.* 1997a; 63(6): 2446–2448.
- Strous M, Gerven EV, Zheng P, Kuenen JG, Jetten MS. Ammonium removal from concentrated waste streams with the anaerobic ammonium oxidation (anammox) process in different reactor configurations. *Water Res.* 1997b; 31: 1955–1962.
- Strous M, Heijnen JJ, Kuenen JG, Jetten MSM. The sequencing batch reactor as a powerful tool for the study of slowly growing anaerobic ammonium-oxidizing microorganisms. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 1998; 50: 589–596.
- Strous M, Kuenen JG, Jetten MSM. Key physiology of anaerobic ammonium oxidation. *Appl. Environ. Microbiol.* 1999a; 65(7): 3248–3250.
- Strous M, Fuerst JA, Kramer EH, Logemann S, Meyer G, van de Pas-Schoonen KT, Webb R, Kuenen JG, Jetten MS. Missing lithotroph identified as new *planctomycete*. *Nature* 1999b; 400: 446–449.
- Suantika G, Dhert P, Nurhudah N, Sorgeloos P. High-density production of rotifer *Brachionus plicatilis* in recirculated system: consideration of water quality, zootechnical and nutrient aspects. *Aquacultural Engineering* 2000; 21: 201–214.
- Suantika G, Dhert P, Sweetman E, O’Brien E, Sorgeloos P. Technical and economical feasibility of a rotifer recirculation system. *Aquaculture* 2003; 227: 173–189.
- 杉田治男. プロバイオティクスの魚介類への応用. 「微生物の利用と制御—食の安全から環境保全まで 水産学シリーズ (日本水産学会監修. 藤井建夫, 杉田治男,

- 左子芳彦編) 恒星社厚生閣, 東京. 2007; 57-69.
- Sumino T, Nakamura H, Mori N. Immobilization of activated sludge by the acrylamide method. *J. Ferment. Bioeng.* 1991; 72: 141-143.
- Sumino T, Nakamura H, Mori N, Kawaguchi Y. Immobilization of nitrifying bacteria by polyethylene glycol prepolymer. *J. Ferment. Bioeng.* 1992; 73: 37-42.
- Suminto K, Hirayama K. Effects of bacterial coexistence on the growth of a marine diatom *Chaetoceros gracilis*. *Fisheries Science* 1996; 62(1): 40-43.
- Suminto K, Hirayama K. 1997. Application of a growth-promoting bacterium for stable mass culture of three marine microalgae. *Hydrobiologia* 1997; 358: 223-230.
- Summerfelt ST, Sharrer MJ, Tsukuda SM, Gearheart M. Process requirements for achieving full-flow disinfection of recirculating water using ozonation and UV irradiation. *Aquacultural Engineering* 2009; 40: 17-27.
- Sung-Koo K, Kong I, Lee B. Removal of ammonium-N from a recirculation aquaculture system using a immobilized nitrifier. *Aquacultural Engineering* 2000; 21: 139-150.
- 高橋庸一. ヒラメの種苗生産マニュアル「ほっとけ飼育」による飼育方法- 栽培漁業技術シリーズ 4, 日本栽培漁業協会, 東京. 1998; 1-57.
- Tal Y, Watts JE, Schreier HJ. Anaerobic ammonia-oxidizing bacteria and related activity in Baltimore inner harbor sediment. *Appl. Environ. Microbiol.* 2005; 71: 1816-1821.
- Tal Y, Nussinovitch A, van Rijn J. Nitrate removal in aquariums by immobilized denitrifiers. *Biotechnol. Prog.* 2003; 19: 1019-1021.
- Tal Y, Watts JEM, Schreier HJ. Anaerobic ammonium-oxidizing (Anammox) bacteria and associated activity in fixed-film biofilters of a marine recirculating aquaculture system. *Appl. Environ. Microbiol.* 2006; 72(4): 2896-2904.
- Tal Y, Nussinovitch A, van Rijn J. Nitrate removal in aquariums by immobilized *Pseudomonas*. *Biotechnol. Progress* 2003; 19: 1019-1021.
- 照屋和久. クエ種苗生産の初期減耗対策, 養殖, 東京. 2002; 66-69.
- Tinh NTN, Dierckens K, Sorgeloos P, Bossier P. A review of the functionality of probiotics in the larviculture food chain. *Mar. Biotechnol.* 2008; 10: 1-12.
- Toh SK, Webb RI, Ashbolt NJ. Enrichment of autotrophic anaerobic ammonium-oxidizing consortia from various wastewaters. *Microb. Ecol.* 2002; 43: 154-167.
- Treusch AH, Leininger S, Kletzin A, Schuster SC, Klenk HP, Schleper C. Novel genes for nitrite reductase and *Amo*-related proteins indicate a role of uncultivated mesophilic crenarchaeota in nitrogen cycling. *Environ. Microbiol.* 2005; 7: 1985-1995.
- Trimmer M, Nicholls JC, Deflandre B. Anaerobic ammonium oxidation measured in sediments along the Thames estuary, United Kingdom. *Appl. Environ. Microbiol.* 2003; 69: 6447-6454.
- Trimmer M, Nicholls JC, Morley N, Davies CA, Aldridge J. Biphasic behavior of anammox regulated by nitrite and nitrate in an estuarine sediment. *Appl. Environ. Microbiol.* 2005; 71: 1923-1930.
- 植本弘明, 菊池弘太郎, 清野通康. 海洋性硝化細菌の固定化とその有効性-高能率魚類生産のための水質浄化技術の開発(6). 電力中央研究所報告研究報告 1991; U90056: 1-26.
- 植本弘明, 菊池弘太郎, 清野通康. 海洋性硝化細菌の分離, 培養および固定化法-高能率魚類生産のための水質浄化技術の開発(8). 電力中央研究所報告研究報告 1993; U93022: 1-21.
- 植本弘明, 渡部良朋, 菊池弘太郎. ヒラメ飼育への固定化微生物の適用-高能率魚類生産のための水質浄化技術の開発(10). 電力中央研究所報告研究報告 1994; U93048: 1-22.
- Uribe C, Floch H, Enriquez R, Moran G. Innate and adaptive immunity in teleost fish: a review. *Veterinari Medicina* 2011; 56(10): 486-503.
- Vadstein O, Øie G, Olsen Y, Salvesen I, Skjermo J, Skjak-Braek G. A strategy to obtain microbial control during larval development of marine fish, p. 69-75. In H. Reinertsen, L. A. Dahle, L. Jørgensen, and K. Tvinnereim (ed.), Proceedings of the First International Conference on Fish Farming Technology. Balkema, Rotterdam, The Netherlands. 1993.
- van de Graaf AA, Mulder A, de Bruijn P, Jetten MSM, Robertson LA, Kuenen JG. Anaerobic oxidation of ammonium is a biologically mediated process. *Appl. Environ. Microbiol.* 1995; 61: 1246-1251.
- van de Vossenberg J, Rattray JE, Greets W, Kartal B, van Niftrik L, van Donselaar EG, Sinningle Damste JS, Strous M, Jetten MS. Enrichment and characterization of marine anammox bacteria associated with global nitrogen gas production. *Environ. Microbiol.* 2008; 10: 3120-3129.
- van de Vossenberg J, Woebken D, Maalcke WJ, Wessels

- HJCT, Dutilh BE, Kartal B, Janssen-Megens EM, Roeselers G, Yan J, Speth D, Gloerich J, Geerts W, van der Biezen E, Pluk W, Francoijs K-J, Russ L, Lam P, Malfatti SA, Tringe SG, Haaijer SCM, Op den Camp HJM, Stunnenberg HG, Amann R, Kuypers MMM, Jetten, MSM. The metagenome of the marine anammox bacterium '*Candidatus Scalindua profunda*' illustrates the versatility of this globally important nitrogen cycle bacterium. *Environ. Microbiol.* 2013; 15(5): 1275-1289.
- Venkat HK, Sahu NP Jain KK. Effect of feeding Lactobacillus-based probiotics on the gut microflora, growth and survival of postlarvae of *Macrobrachium rosenbergii* (de Man). *Aquaculture Res* 2004; 35: 501-507.
- Venter JC, Remington K, Heidelberg JF, Halpern AL, Rusch D, Eisen JA, Wu D, Paulsen I, Nelson KE, Nelson Fouts WD, Levy S, Knap AH, Lomas MW, Nealson K, White O, Peterson J, Hoffman J, Parsons R, Baden-Tillson H, Pfannkoch C, Rogers YH, Smith HO. Environmental genome shotgun sequencing of the Sargasso Sea. *Science* 2004; 304: 66-74.
- Verner-Jeffreys DW, Shields RJ, Bricknell IR, Brickbeck TH. Changes in the gut-associated microflora during the development of Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L) larvae in three British hatcheries. *Aquaculture* 2003; 219: 21-42.
- Verschuere L, Rombaut G, Huys G, Dhont J, Sorgeloos P, Verstraete W. Microbial control of the culture of *Artemia* juveniles through preemptive colonization by selected bacterial strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 1999; 65: 2527-2533.
- Verschuere L, Heang H, Criel G, Dafnis S, Sorgeloos P, Verstraete W. Protection of *Artemia* against the pathogenic effects of *Vibrio proteolyticus* CW8T2 by selected bacterial strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 2000; 66: 1139-1146.
- Verschuere L, Rombaut G, Sorgeloos P, Verstraete W. Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2000; 64: 655-671.
- Villamil L, Figueras A, Planas M, Novoa B. Control of *Vibrio alginolyticus* in *Artemia* culture by treatment with bacterial probiotics. *Aquaculture* 2003; 219: 43-56.
- Vine NG, Leukes WD, Kaiser H. Probiotics in marine larviculture. *FEMS Microbiol. Rev.* 2006; 30: 404-427.
- Walker CB, de la Torre JR, Klotz MG, Urakawa H, Pinel N, Arp DJ, Brochier-Armanet C, Chain PS, Chan PP, Gollabgir A, Hemp J, Hugler M, Karr EA, Konneke M, Shin M, Lawton TJ, Lowe T, Martens-Habbena W, Sayavedra-Soto LA, Lang D, Sievert SM, Rosenzweig AC, Manning G, Stahl DA. *Nitrosopumilus maritimus* genome reveals unique mechanisms for nitrification and autotrophy in globally distributed marine crenarchaea. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2010; 107: 8818-8823.
- Wang YB, Li JR, Lin J. Probiotics in aquaculture: challenges and outlook. *Aquaculture* 2008; 281: 1-4.
- 渡部良朋, 菊池弘太郎, 植本弘明, 清野通康. 海洋性脱窒菌の大量培養ならびに固定化した脱窒菌の脱窒能力—高能率魚類生産のための水質浄化技術の開発(9). 電力中央研究所報告研究報告 1993; U93023: 1-22.
- Wu YJ, Whang LM, Fukushima T, Chang SH. Responses of ammonia-oxidizing archaeal and betaproteobacterial populations to wastewater salinity in a full-scale municipal wastewater treatment plant. *J. Biosci. Bioeng.* 2013; 115(4): 424-432.
- Wuchter C, Abbas B, Coolen MJL, Herfort L, van Bleijswijk J, Timmers P, Strous M, Teira E, Herndl GJ, Middelburg JJ, Schouten S, Sinninghe Damste JS. Archaeal nitrification in the ocean. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2006; 103: 12317-12322.
- Xu M, Schnorr J, Keibler B, Simon HM. Comparative analysis of 16S rRNA and *amoA* genes from archaea selected with organic and inorganic amendments in enrichment culture. *Appl. Environ. Microbiol.* 2012; 78(7): 2137-2146.
- 山本俊政. 人工飼育水. 特開 2010-193902(P2010-193902 A). 2010.
- 山本義久. マダイを対象とした閉鎖循環飼育—Ⅱ—人工海水の利用—. 栽培漁業センター技報 2008; 7: 23-28.
- 山本義久. 閉鎖循環飼育システム開発と欧州の閉鎖循環養殖研究の現状. 平成23年度栽培漁業技術研修会テキスト集—省力化・省エネ化・低コスト化に役立つ増養殖技術—. (社)全国豊かな海づくり推進協会, 東京. 2011; 1-18.
- 吉水 守, 笠井久会. 微生物による魚病原因ウイルスの制御. 「微生物の利用と制御—食の安全から環境保全まで. 水産学シリーズ (日本水産学会監修, 藤井建夫, 杉田治男, 左子芳彦編)」。恒星社厚生閣, 東京. 2007; 70-82.
- Yoshimura K, Usuki K, Yoshimatsu T, Kitajima C, Hagiwara A. Recent development of a high density mass culture

system for the rotifer *Brachionus rotundiformis* Tschugunoff. *Hydrobiologia* 1997; 358: 139–144.

Yousefian M, Amiri MS. A review of the use of prebiotic in aquaculture for fish and shrimp. *Afr. J. Biotechnol.* 2009; 8: 7313–7318.

Zhang T, Jin T, Yan Q, Shao M, Wells G, Criddle C, P Fang HH. Occurrence of ammonia-oxidizing Archaea in activated sludges of a laboratory scale reactor and two wastewater treatment plants. *J. Appl. Microbiol.* 2009; 107: 970–977.