

◇資料◇

エビ養殖へのセラクリーン®施用の効果

Effect of Ceraclean® in Application to Shrimp Culture

花田 晶子*, 今泉 健太郎**, 三宅 彩香*,
阿部 信彦***, 神谷 隆****, 廣野 育生**

HANADA, Akiko*; IMAIZUMI, Kentaro**; MIYAKE, Ayaka*;
ABE, Nobuhiko***; KAMIYA, Takashi****; HIRONO, Ikuo**

要 旨

エビ養殖は、家畜や他の魚介類よりも飼料転換効率が高く、東南アジア地域を中心に生産が拡大しているが、養殖池の水質悪化や病害による生産性の低下が大きな問題となっている。

多孔質ケイ酸カルシウム水和物「セラクリーン」の施用は、エビ養殖池の水質を維持し、生産性が向上するとして東南アジア地域を中心に普及しつつある。セラクリーンは浄化に有益な細菌の活性を高め、また底質のヘドロ分解を促進し、水環境を適正に保つことができる。一方、今回の研究では、セラクリーンは水中にケイ酸を長期間安定供給することで、養殖水中で珪藻が優占化し、水質を悪化させる窒素酸化物を吸収することがわかった。さらに、珪藻はエビの良質な餌となり餌料効率が向上すること、珪藻の優占化により、近年東南アジアで猛威を振るったエビ感染症原因菌の増殖を抑制し、生存率が向上する等、さまざまな効果があることを新たに確認した。

キーワード : 多孔質ケイ酸カルシウム水和物, 水質浄化材, 養殖, ケイ酸, 珪藻

*中央研究所 第3研究部 資源化学チーム Mineral Resources Chemistry Team, Central Research Laboratory

**東京海洋大学 Tokyo University of Marine Science and Technology

***環境事業部 営業企画グループ Sales Planning Group, Environment Division

****中央研究所 第3研究部 資源化学チーム リーダー

Manager, Mineral Resources Chemistry Team, Central Research Laboratory

ABSTRACT

Shrimp is one of the most worldwide popular aquaculture species. Shrimp culture is widely spread especially in the Southeast Asian region due to its higher feed conversion efficiency compared to livestock farming or other fishery products. However, deterioration of productivity has become a serious problem due to poor water quality of aquaculture ponds and diseases of shrimp.

Use of Ceraclean, a porous calcium silicate hydrate product, is becoming common mainly in Southeast Asia for the maintenance of shrimp pond water quality and improvement of productivity. Ceraclean is a water purification material that enhances the activity of useful bacteria, promotes decomposition of sludge at the bottom of ponds and maintains the water environment properly. It is shown in this study that Ceraclean helps diatom become and remain dominant in the aquaculture water by constantly and continuously supplying silicate to the water, while absorbing nitrogen oxides that deteriorate water quality. The study results also show various good effects that diatom has. Diatom is a good feed for shrimp by itself, which contributes to the improvement of feed efficiency. Being dominant in the pond water, it can also help improve the survival rate by suppressing growth of microorganisms responsible for the infectious shrimp diseases which have spread through the farms in Southeast Asia in recent years.

Keywords : *Porous calcium silicate hydrate, Water purification material, Aquaculture, Silicate, Diatom*

1. はじめに

近年の漁業生産量の停滞に伴い、養殖生産量は増加傾向にある¹⁾。そのなかでもエビ養殖は、家畜や他の魚介類よりも飼料転換効率がよく、東南アジア地域を中心に生産が拡大しているが、養殖池の水質悪化や病害による生産性の低下が大きな問題となっている。また、水質の悪化は、エビの大量死の主要因の一つである病害の流行のリスクを増大させることが知られている²⁾³⁾。よって、水環境の改善は病気の発生を低減するための主要な対策である⁴⁾。

珪藻類は、エビの必須栄養素である不飽和脂肪酸を豊富に含み、エビの良質な餌となることでエビ養殖において重要な役割を果たす⁵⁾。エビ養殖場の一部では、珪藻類の細胞壁の形成に必須である⁶⁾ケイ酸塩のような施肥材の施用によって珪藻類の増殖を促進することが行われている⁷⁾⁸⁾。例えば、*Chaetoceros*属は脂質含有量が高く、バイオフィロックと呼ばれる微生物の凝集体を形成させる養殖システムに貢献することが報告されている⁹⁾。

多孔質ケイ酸カルシウム水和物「セラクリーン」の施用は、エビ養殖池の水質を維持し、pH、硬度、窒素酸化物濃度などを適正に保ち、エビの生産性が向上するとして東南アジア地域を中心に普及しつつある。セラクリーンは浄化に有益な硝化細菌などのバクテリアの活性を高め、また底質のヘドロ分解を促進し、水環境を適正に保つことができることが過去の検討で明らかとなっている。さらに、セラクリーンの主成分の一つであるケイ酸は、水中に溶出することでエビの良質な栄養源となる珪藻を増殖させ、エビの生育向上に直接的に寄与することが期待される。そこで本研究では、セラクリーン施用による珪藻増殖促進によって得られる効能について評価した。

2. 「セラクリーン」施用による珪藻増殖と水質浄化効果

2.1 「セラクリーン」

セラクリーンの化学成分と物理特性、肥料特性をTable 1~3に示す。セラクリーンは多孔質人工ケイ

Table 1 Chemical component (化学成分)

| Component | lg. loss | SiO ₂ | CaO | Al ₂ O ₃ | SO ₃ | Fe ₂ O ₃ | MgO | TiO ₂ | Others |
|-----------------|----------|------------------|------|--------------------------------|-----------------|--------------------------------|-----|------------------|--------|
| Content (mass%) | 11.8 | 50.8 | 26.8 | 3.8 | 2.7 | 1.8 | 0.7 | 0.16 | 1.5 |

Table 2 Physical properties (物理特性)

| pH | Electrical Conductivity (mS/cm) | Water content ratio (%) | Specific surface area (m ² /g) | Porosity (%) |
|-------|---------------------------------|-------------------------|---|--------------|
| 10-11 | 0.5-2 | 20-30 | 50-80 | 60-70 |

Table 3 Characteristics as a fertilizer (肥料特性)

| Soluble* silicate (%) | Soluble* lime (%) | Soluble* magnesium (%) | Alkaline component (%) |
|-----------------------|-------------------|------------------------|------------------------|
| 21.5 | 19.7 | 0.4 | 20.3 |

*0.5M HCl soluble

酸カルシウム水和物(トバモライト)を主成分とし、弱アルカリ性であり、比表面積と空隙率が高いという特徴を持つ。また、0.5M塩酸に可溶であり、生物が吸収しやすい形態であることを意味する可溶性ケイ酸濃度が高く、水中にケイ酸を長期間安定的に溶出させることができる。今回は、このケイ酸溶出特性に着目した。

2.2 バイオフィロック技術

タイを含む東南アジアや韓国等では、バイオフィロック技術と呼ばれるエビ養殖技術が注目され普及しつつある。バイオフィロック技術とは、養殖水中にバイオフィロックと呼ばれる微生物の塊を人為的に作る技術のことで、給餌や排泄物の分解により発生する有害なアンモニアや亜硝酸を減少させ、バイオフィロック自体はタンパク源としてエビの餌になるという効果があるとされている¹⁰⁾。エビ養殖での効果としては、養殖水の適度な濁りによるストレス緩和や共食いの減少、生物相を安定させることによる水質の維持や病原細菌などの有害生物の侵入防止、発生した微生物をエビが摂食することによる餌料効果の向上等が期待されている(Fig. 1)。

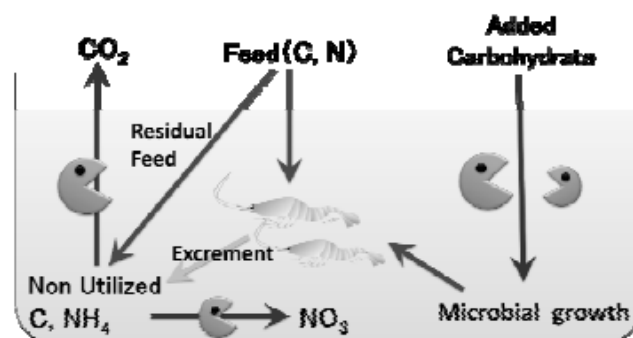


Fig. 1 Scheme of Biofloc technology system (バイオフィロック技術概要)

2.3 「セラクリーン」施用による珪藻増殖と水質浄化効果の検証

一般に、水質の安定した養殖池では、有機物の分解によって発生するアンモニウムイオンは、硝化細菌が硝化反応によって亜硝酸イオン、さらには硝酸イオンとなり、養殖水中に蓄積する。硝酸イオン自身の毒性は低いが、pHの低下を引き起こし、硝化細菌の硝化反応を抑制したり、エビの生育に悪影響を及ぼす。

一方、セラクリーンには水中にケイ酸を長期間安定的に溶出する効果がある。このような特性を持つ資材は少なく、珪藻類を長期間安定増殖させるには優れた資材であると考えられる。

珪藻類は、光合成を行う際に硝酸イオンを吸収する。そこで、セラクリーンを施用して珪藻類の一種でエビ幼生の良質な餌となる *Chaetoceros gracilis* をあらかじめ優占化させたタンク(セラクリーン区)と、

タンクを遮光して藻類を一切増殖させず外付けフィルターを用いて細菌類のみで水質を維持するタンク(対照区)を作製した。そこにバナメイエビの稚エビを投入して28日間飼育し、エビの平均体重の経時変化、飼育28日後の生存率、水中の窒素化合物(アンモニウムイオン、亜硝酸イオン、硝酸イオン)濃度の経時変化を評価した。その結果を Fig. 2~5 に示す。

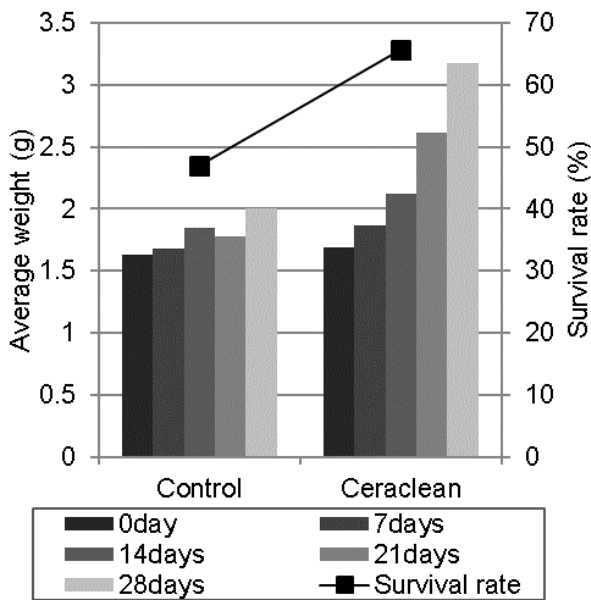


Fig. 2 Effect of Ceraclean on growth and survival rate of shrimp (セラクリーンによるエビの生育および生存率への効能)

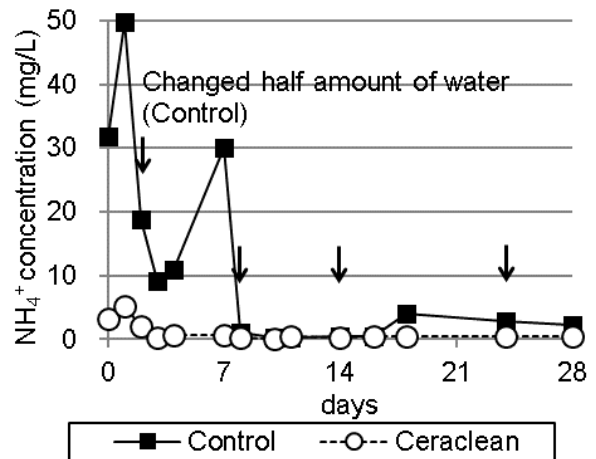


Fig. 3 Effect of Ceraclean on ammonium ion concentration in water (↓: In the control group, half of the water was replaced 4 times) (セラクリーンが水中のアンモニウムイオン濃度に及ぼす効能 (↓: 対照区では半量の水を4回交換した))

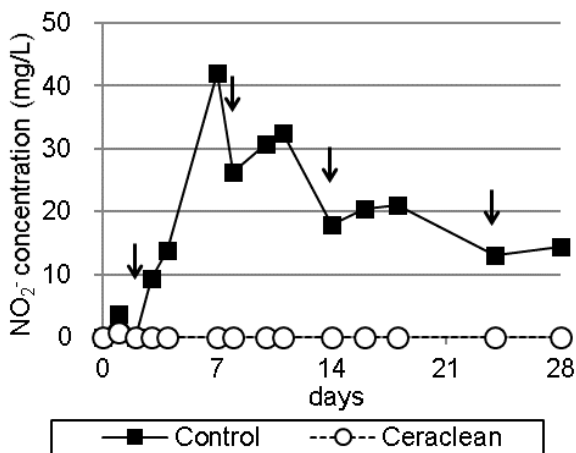


Fig. 4 Effect of Ceraclean on nitrite ion concentration in water (セラクリーンが水中の亜硝酸イオン濃度に及ぼす効能)

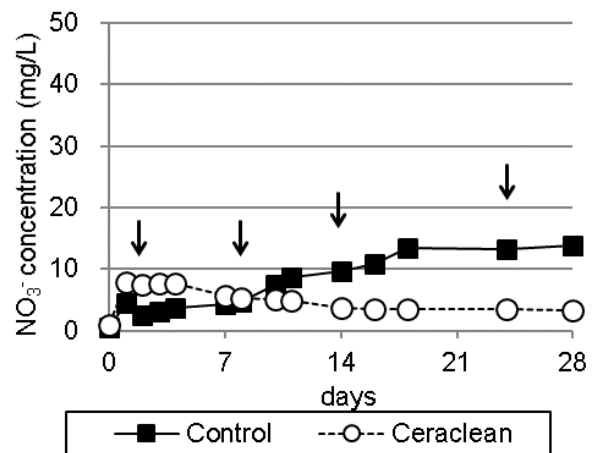


Fig. 5 Effect of Ceraclean on nitrate ion concentration in water (セラクリーンが水中の硝酸イオン濃度に及ぼす効能)

ただし、対照区ではエビに毒性のあるアンモニウムイオン、亜硝酸イオン濃度の上昇が著しかったため、2, 7, 14, 21日後に飼育水の半量を交換した。Fig. 2より、生存率、平均体重ともに対照区に対しセラクリーン区は向上した。Fig. 3~5より、対照区では硝化細菌によるアンモニウムイオンや亜硝酸イオンの除去が不十分であったうえ、硝酸イオンがタンク中に蓄積したのに対し、セラクリーン区ではアンモニウムイオン、亜硝酸イオンが十分に除去され、さらに硝酸イオンも飼育4日目以降減少し、珪藻の光合成反応によって硝酸イオンが除去されたことが確認できた。よって、セラクリーンの施用は、窒素化合物の除去に有効であることがわかった。

3. 「セラクリーン」施用とバイオフィロック技術による病原菌増殖抑制効果

3.1 EMS/AHPND

EMS/AHPND (Early Mortality Syndrome / Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease : 早期死亡症候群/急性肝臓壊死病)¹¹⁾¹²⁾とは、稚エビに大量死を引き起こす病気のことで¹³⁾、2009年に中国で発生し始め、近年東南アジア諸国でも被害が報告された¹⁴⁾¹⁵⁾。EMS/AHPNDの原因細菌の一つは腸炎ビブリオである *Vibrio parahaemolyticus* 細菌の一種 (以下 *Vibrio* 菌) であることが明らかとなっている¹²⁾¹⁶⁾。EMS/AHPND感染による致死率はほぼ100%とされており、感染後の対処法は見い出されていない。

3.2 感染試験による病原菌抑制効果の検証

EMS/AHPND感染を防止するには、養殖池の微生物相を安定化させ、外部からの原因細菌の侵入、増殖を抑制することが重要である。そこで、セラクリーン施用とバイオフィロック技術を組み合わせることで微生物相を安定化させ、原因細菌である *Vibrio* 菌の侵入、増殖を抑制できるかを検証した。

試験は、対照区、セラクリーン+バイオフィロック区、バイオフィロック区の3水準とした。対照区は外付けフィルターを用い循環濾過にて水質を維持し、セラクリーン+バイオフィロック区はセラクリーンを1週間毎に30mg/L施用した。また、セラクリーン+バイオフィロック区およびバイオフィロック区は、前培養したバイオフィロックを用いた。

各試験区100尾のバナメイエビの稚エビを100L水槽で5週間飼育し、馴致した。その後、各試験区13尾と飼育水50Lを2水槽に入れ、それぞれの飼育

環境下での感染試験を実施した。

感染試験は、EMS/AHPND原因細菌である *Vibrio* 菌を飼育水に各試験区高濃度 (9×10^5 cell/mL) ならびに低濃度 (3×10^5 cell/mL) で接種し、浸漬感染して14日間生存率の評価を実施した。また、接種24時間後に3尾ずつ抽出してエラ中のRNA (ribonucleic acid : リボ核酸) を採取し、RT-PCR (Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction : 逆転写ポリメラーゼ連鎖反応) 法に供して、EMS/AHPND感染による免疫関連遺伝子 (抗菌タンパク質のリゾチウム、クラスチンとペナエイジン3、メラニン化に関与するプロフェノールオキシダーゼならびにコントロールとしてエロンゲーションファクター1 α 遺伝子) の増幅DNAを得た。得られた増幅DNAをゲル電気泳動に供し、エチレンブロマイドで染色した後、UV照射して発光強度によって発現量を評価した。

感染試験結果をFig. 6, 7に示す。対照区は高濃度、低濃度接種ともに感染後10日でエビの生存率が0%となり、EMS/AHPND感染により死滅した。それに対して、セラクリーン+バイオフィロック区は高用量、低用量接種ともに感染後14日後まで80%と高い生存率を示した。また、バイオフィロック区においても高濃度接種で感染後14日後まで80%、低濃度接種で100%と同等以上の高い生存率を維持した。

EMS/AHPND感染による免疫関連遺伝子の発現変動評価結果をFig. 8に示す。なおFig. 8は、白色バンドの色調が強いほど遺伝子発現量が多いことを意味する。遺伝子発現に個体差はみられたが、セラクリーン施用やバイオフィロック技術による免疫関連遺伝子の発現に明瞭な差はみられなかった。よって、セラクリーン施用やバイオフィロック技術による感染試験での生存率向上は、エビの免疫機能の向上によるものではないことが示唆された。

3.3 感染試験における *Vibrio* 菌の水槽内での消長

3.2の感染試験において、*Vibrio* 菌接種前、接種48時間後における飼育水中の *Vibrio* 菌の生菌数を、寒天培地を用いて測定した。その結果をFig. 9に示す。48時間後の生菌数が、セラクリーン+バイオフィロック区およびバイオフィロック区では対照区に対して低減され、飼育水中での *Vibrio* 菌の増殖が抑制されたことがわかった。よって、バイオフィロック技術により飼育水中の微生物相をあらかじめ安定化させることで、*Vibrio* 菌の増殖、定着を抑制することができることが明らかとなった。

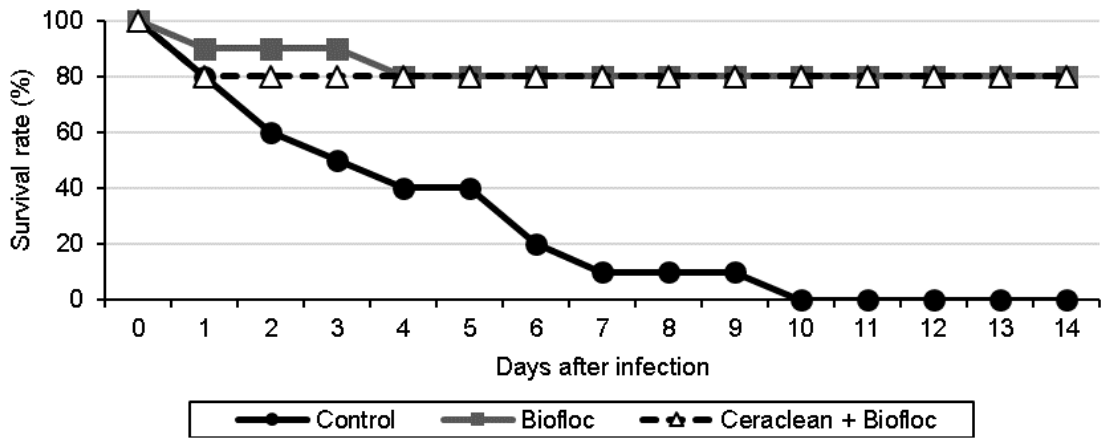


Fig. 6 The survival rate of shrimp after EMS/AHPND infection (High dose, 9×10^5 cells/mL) (EMS/AHPND原因菌感染後のエビの生存率(高用量, 9×10^5 cells/mL))

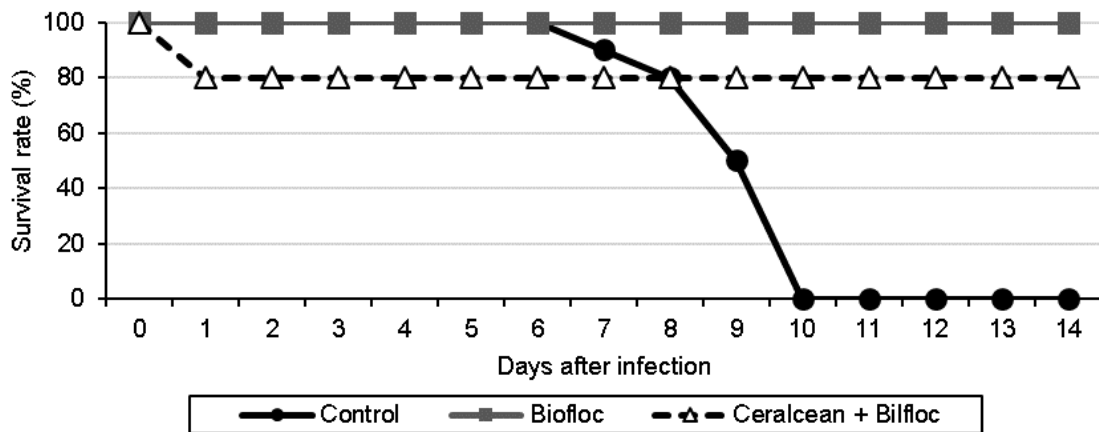
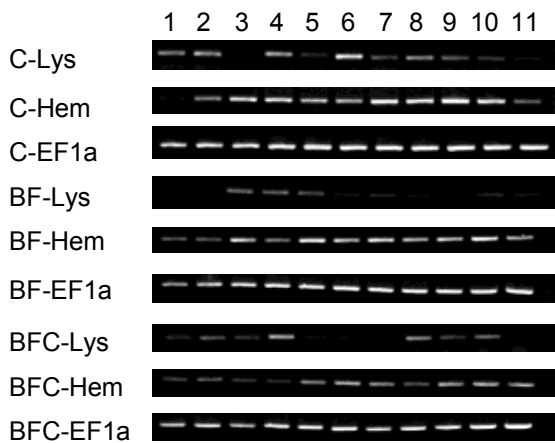


Fig. 7 The survival rate of shrimp after EMS/AHPND infection (Low dose, 3×10^5 cells/mL) (EMS/AHPND原因菌感染後のエビの生存率(低用量, 3×10^5 cells/mL))



Lane1-5: After cultured for 5 weeks;
 Lane6-8: 24 hours after EMS/AHPND infection (High dose);
 Lane9-11: 24 hours after EMS/AHPND infection (Low dose),
 C: group of control; BF: group of Biofloc;
 BFC: group of Ceraclean + Biofloc,
 Lys: Lysozyme; Hem: Haemocyanin;
 EF1a: Elongation Factor 1 α

Fig. 8 Expression fluctuation analysis of immune related genes of shrimp (バナメイエビの免疫関連遺伝子の発現変動解析)

3.4 珪藻類優占化により期待されるエビ生存率向上効果

3.3より、バイオフィロック技術を用いることで、EMS/AHPND感染を防ぐことができることが明らかとなった。一方で、エビの大量死を引き起こす原因は他にもある。その一つが有毒渦鞭毛藻の増殖である。有毒渦鞭毛藻は、貝毒などの食中毒の原因となる毒性物質を産生し、貝類を毒に汚染するほか、エビをはじめとする魚介類の大量死を引き起こす。

セラクリーンは、ケイ酸の供給により珪藻類の増殖を促進させることで、このような有毒渦鞭毛藻の増殖を抑制することができると考えられる。よって、セラクリーン施用とバイオフィロック技術を併用することで、珪藻類を中心とする微生物相に安定化させ、病原細菌や有毒渦鞭毛藻などの有害有毒藻類の侵入、増殖を抑制し、エビの大量死を防ぐ効果が期待できる。

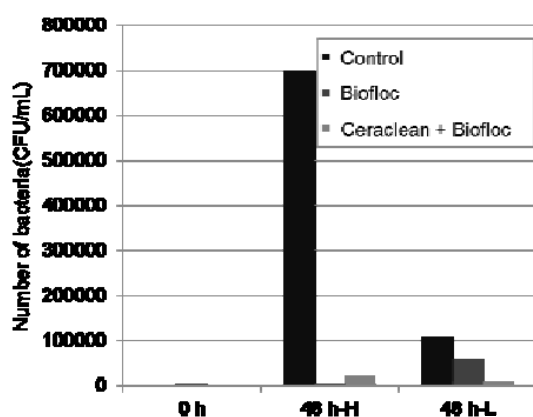


Fig. 9 Prevalence of EMS / AHPND causative bacteria used in the infection test for 48 hours (感染試験で用いたEMS/AHPND原因菌の48時間での消長)

3.5 ケイ酸がエビ体内に吸収されることで得られる副次的効果

ケイ酸は近年、骨形成やコラーゲン形成に重要な機能性成分として注目されており、ヒトにおいては、骨粗しょう症の治療薬等に用いられている。3.2の感染試験において、3試験区で5週間飼育したエビについて、むき身と甲殻中のケイ酸含有量の評価を行った。その結果をFig. 10に示す。むき身、甲殻ともにセラクリーン+バイオフィロック区で、対照区ならびにバイオフィロック区と比べて3倍以上ケイ酸含有量が向上した。これは、セラクリーンから水中に溶出したケイ酸をエビが体内に取り込んだこと、およびケイ酸を吸収して増殖した珪藻類をエビが捕食したことによると考えられる。機能性成分であるケイ酸含有量が向上することで、エビの食品としての高付加価値化につながると期待される。

4. まとめ

セラクリーンは、pHの低下を防ぎ、微生物の担持体となって水質を向上させることに加え、今回の研究によって、ケイ酸を供給することで珪藻の増殖を促進し、エビの餌料効率向上や病原菌の侵入・増殖の抑制による生存率の向上、養殖エビの食品価値の向上といった効果が期待できることが新たに明らかとなった。この効果は、エビ以外の甲殻類の養殖や二枚貝の養殖などにも応用可能であると考えられ、今後、それらについても検討を実施していく予定である。また、珪藻は養殖に限らず水域環境の保全にも重要な存在であり、近年劣化が問題となっている干潟の再生等への活用についても現在検討中である。

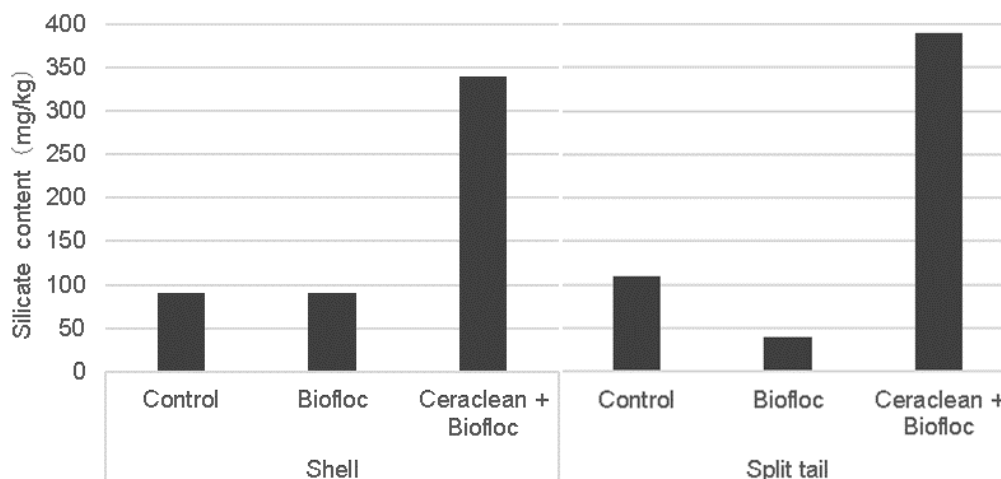


Fig. 10 Silicate concentration in split tail and shell of shrimp (エビむき身および甲殻中のケイ酸含有量)

参 考 文 献

- 1) 水産総合研究センター. 水産育種研究戦略－水産育種研究の今後の進め方について－. 2013.
- 2) Walker, P. J. ; Winton, J. R. . Emerging viral diseases of fish and shrimp. *Veterinary Research*. 2010, 41 (6), p. 41-51.
- 3) Wiyoto, W. ; Sukenda, S. ; Harris, E. ; Nirmala, K. ; Djokosetiyanto, D. . The effect of sediment redox potential and stocking density on Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* production performance and white spot syndrome virus resistance. *Aquaculture Research*. 2016, 48(6), p. 2741-2751.
- 4) Ekasari, J. ; Azhar, M. H. ; Surawidjaja, E. H. ; Nuryati, S. ; DeSchryver, P. ; Bossier, P. . Immune response and disease resistance of shrimp fed bilfloc grown on different carbon sources. *Fish & Shellfish Immunology*. 2014, 41(2), p. 332-339.
- 5) Lebeau, T. ; Robert, J. M. . Diatom cultivation and biotechnologically relevant products. Part I: Cultivation at various scales. *Applied Micro-biology and Biotechnology*. 2003, 60(6), p. 612-623.
- 6) Turpin, V. ; Robert, J. M. ; Gouilletquer, P. . Limiting nutrients of oyster pond seawater in the Marennes-Oleron region for *Haslea ostrearia*: applications to the mass production of the diatom in mesocosm experiments. *Aquatic Living Resources*. 1999, 12(5), p. 335-342.
- 7) Falciatore, A. ; Bowler, C. . Revealing the molecular secrets of marine diatoms. *Annual Review of Plant Biology*. 2002, 53, p. 109-130.
- 8) Correia, E. S. ; Wilkenfeld, J. S. ; Morris, T. C. ; Wei, L. ; Prangnell, D. I. ; Samocha, T. M. . Intensive nursery production of the Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* using two commercial feeds with high and low protein content in a bilfloc-dominated system. *Aquacultural Engineering*. 2014, 59, p. 48-54.
- 9) Marinho, Y. F. ; Brito, L. O. ; Da Silva Campos, C. V. F. ; Severi, W. ; Andrade, H. A. ; Galvez, A. O. . Effect of the addition of *Chaetoceros calcitrans*, *Navicula* sp. and *Phaeodactylum tricornutum* (diatoms) on phytoplankton composition and growth of *Litopenaeus vannamei* (Boone) postlarvae reared in a biofloc system. *Aquaculture Research*. 2017, 48(8), p. 4155-4164.
- 10) Avnimelech, Y. ed. . *Biofloc Technology: A Practical Guide Book*. World Aquaculture Society, 2009.
- 11) Flegel, T. W. . Historic emergence, impact and current status of shrimp pathogens in Asia. *Journal of Invertebrate Pathology*. 2012, 110(2), p. 166-173.
- 12) Tran, L. ; Nunan, L. ; Redman, R. M. ; Mohny, L. L. ; Pantoja, C. R. ; Fitzsimmons, K. ; Lightner, D. V. . Determination of the infectious nature of the agent of acute hepatopancreatic necrosis syndrome affectin penaeid shrimp. *Diseases of Aquatic Organisms*. 2013, 105(1), p. 45-55.
- 13) Food and Agriculture Organization of the United Nations. Report of the FAO/MARD Technical Workshop on Early Mortality Syndrome (EMS) or Acute Hepatopancreatic Necrosis Syndrome (AHPNS) of Cultured Shrimp (under TCP/VIE/3304). FAO Fisheries and Aquaculture Report No. 1053. 2013.
- 14) Leñaño, E. M. ; Mohan, C. V. . Early mortality syndrome threatens Asia's shrimp farms. *Global Aquaculture Advocate*. 2012, 7/8, p. 38-39.
- 15) Zorriehzahra, M. J. ; Banaederakhshan, R. . Early Mortality Syndrome (EMS) as new emerging threat in Shrimp Industry. *Advances in Animal and Veterinary Sciences*. March 2015, 3(2), p. 64-72.
- 16) Kondo, H. ; Tinwongger, S. ; Proespraiwong, P. ; Mavichak, R. ; Unajak, S. ; Nozaki, R. ; Hirono, I. . Draft Genome Sequences of Six Strains of *Vivrio parahaemolyticus* isolated from Early Mortality Syndrome/Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease Shrimp in Thailand. *Genome Announcements*. 2014, 2(2), e00221-14.