



Title	ハナサキガニ幼生の大量死に関する細菌学的研究：幼生および種苗生産水槽の細菌叢
Author(s)	渡辺, 研一; 高橋, 誠; 鎌田, 研一; 杉澤, 輝文; 吉水, 守
Citation	北海道大學水産學部研究彙報, 49(2), 59-69
Issue Date	1998-08
Doc URL	<a href="http://hdl.handle.net/2115/24169">http://hdl.handle.net/2115/24169</a>
Type	bulletin (article)
File Information	49(2)_P59-69.pdf



[Instructions for use](#)

ハナサキガニ幼生の大量死に関する細菌学的研究  
—幼生および種苗生産水槽の細菌叢—

渡辺 研一<sup>1)</sup>・高橋 誠<sup>1)</sup>・鎌田 研一<sup>2)</sup>  
杉澤 輝文<sup>2)</sup>・吉水 守<sup>2)</sup>

Bacteriological Study on the Mass Mortality of Cultured Hanasakicrab  
Larvae—Bacterial flora of cultured hanasakicrab larvae

Ken-ichi WATANABE<sup>1)</sup>, Makoto TAKAHASHI<sup>1)</sup>, Ken-ichi KAMATA<sup>2)</sup>,  
Teruhumi SUGISAWA<sup>2)</sup> and Mamoru YOSHIMIZU<sup>2)</sup>

Abstract

Mass mortality occurred in cultured Hanasakicrab larvae at zoea III and glaucothoe stage. The typical symptoms of the diseased larvae were cloudiness of intestine and mid-gut. Numerous *Vibrio* spp. were isolated dominantly from diseased larval intestine. The viable bacterial counts of larvae both external and internal were increased day by day from  $10^4$  to  $10^7$  CFU/g. Among the rearing waters and *Thalassiosira* sp., feed for larvae, *Pseudomonas*, *Alteromonas* and *Moraxella* consisted in dominant groups, and intestine of larvae, *Vibrio* was dominant. At glaucothoe stage, diseased larvae showed a larger number of viable bacterial counts ( $10^7$  to  $10^8$  CFU/g) than healthy larvae ( $10^5$  to  $10^7$  CFU/g), and *Vibrio* spp. were dominant in internal microflora of diseased larvae. For 3 days after zoea III stage, the larvae were treated with oxytetracycline hydrochloride (OTC), 5  $\mu$ g/ml to prevent the disease. The intestinal viable bacterial counts of treated larvae were less than non-treated larvae, and survival rate of larvae treated with OTC were higher (70%) than non-treated larvae (50%). Therefore, treatment with OTC was an effective method to prevent the disease.

Key words: Hanasakicrab, *Paralithodes brevipes*, Bacterial flora, Oxytetracycline

結 言

ハナサキガニ *Paralithodes brevipes* BRANDT は北海道東部海域から千島列島, カムチャッカ半島にわたって生息する甲殻類で, 十脚目異尾亜目に属し同属にタラバガニが含まれる。本種は沿岸性で根室近海では重要な漁獲対象種となっていたが, 近年その資源量が大幅に減少し資源増殖が望まれている。

(社) 日本栽培漁業協会厚岸事業場 (以下厚岸事業場) では, 開所当初から栽培漁業の重要対象種として本種の種苗生産技術開発に着手し, 1982年には十万尾近くの第1期稚ガニを生産することに成功し, 1987年には百万尾近くの第1期稚ガニを生産することに成功した。

<sup>1)</sup> 日本栽培漁業協会厚岸事業場

(Akkeshi Station of Japan Sea-Farming Association)

<sup>2)</sup> 北海道大学水産学部生物化学工学講座 (旧微生物学講座)

(Laboratory of Biochemical Process Technology, Faculty of Fisheries, Hokkaido University)

しかしながら、1988年にはグ라우コトエ期幼生に消化管及び中腸腺の白濁を特徴とする疾病が発生し、稚ガニの生産は全くできなくなった。

本研究では、種苗生産過程で用いる飼育用水および餌料の細菌叢と発病群を含むハナサキガニ幼生の体表、消化管の細菌叢を微生物生態学的に比較検討し、合わせて塩酸オキシテトラサイクリン(水産用テラマイシン) 5  $\mu\text{g/ml}$  の薬浴効果についても検討したので報告する。

## 材料と方法

### ハナサキガニ幼生の飼育

ハナサキガニ幼生は、厚岸事業場で飼育中の親ガニから孵化したものをを用いた。1992年と1993年にハナサキガニ幼生の飼育水槽として4 m<sup>3</sup> FRP水槽(直径2.2 m, 高さ1.2 m) 2面ずつを用意し、幼生の密度が10,000尾/m<sup>3</sup>程度となるように孵出直後のゾエアを収容した。試験区は、両年ともにゾエア3齢期に塩酸オキシテトラサイクリンによる薬浴を行う薬浴区と行わない対照区とした。飼育水温は、収容時の4°Cから徐々に加温し、9~10°Cを維持するようにした。換水は、収容時に低水位としたため数日間は注水のみを行い、その後は20%の割合で行った。水質維持の目的でナンクロロプシスを30~50万cells/mlとなるように飼育水に添加した。通気は2個のエアーストーンにより行った。餌料は珪藻とアルテミアノープリウスをグ라우コトエ期になるまで給餌した。珪藻は *Thalassiosira* sp. を用い、飼育水中の珪藻密度が3,000~5,000 cells/mlとなるように添加した。グ라우コトエ期幼生が出現してからは、幼生を付着させる目的で30目のネットを円筒状に張った付着ネットを1水槽あたり4個ずつ垂下した。底掃除はグ라우コトエ期幼生が出現するまで週2回行った。薬浴区ではゾエア3齢期の初期に塩酸オキシテトラサイクリンを用いて5  $\mu\text{g/ml}$  の薬浴を行い、その後換水率20%で飼育を継続した。取り扱いはグ라우コトエ期の後期に行った。

### 供試飼育用水

1992年と1993年の上記飼育水槽に供給するろ過海水を種苗生産過程に沿って合計6回、飼育水槽への給水管から滅菌中試験管を用いて採取した。また、両年の飼育水槽内の飼育水を合計3回、滅菌中試験管を用いて直接採取した。

### 供試飼育用餌料

1992年と1993年にハナサキガニ幼生の飼育のために培養中の珪藻 *Thalassiosira* sp. を計4回、培養水槽に備え付けのネットを用いてろ過採取し、ストマッカー用ポリ袋(オルガノ)に移した。

### 供試ハナサキガニ

1992年と1993年の種苗生産過程のハナサキガニ幼生について、薬浴区から計7回、対照区から計10回、消化管の白濁が確認されたハナサキガニ幼生から5回それぞれ採取した。

### 生菌数の測定法

飼育用水および飼育水はそのまま原液から、飼育用餌料および供試ハナサキガニの体表(消化管を含む)は、試料を秤量後9倍量の滅菌75% Herbst人工海水を加えてストマッカー用ポリ袋によりホモジナイズし、10倍希釈法による希釈液列を作製した。さらに供試ハナサキガニ幼生の一部については、Muroga et al. (1987)の方法にしたがい滅菌ステンレス茶こしに、供試ハナサキガニを取り0.1%塩化ベンザルコニウム水溶液に30秒間浸漬し、その後水道水で1分間洗浄し

た。洗浄後、前述の体表試料と同様にホモジナイズし、この試料の生菌数をもって消化管の生菌数とした。各試料の希釈液 0.1 ml を海水培地 (Yamamoto et al., 1982) 平板に塗抹し、20°C で 7 日間好氣的に培養して出現コロニー数から生菌数を常法により算出した。なお生菌数は飼育用水では 1 ml あたり、他は湿重量 1 g あたりとして算出した。

#### 供試菌株の分離・分類法

飼育用水は 4 検体、餌料は 3 検体、ハナサキガニ幼生では対照区の 6 検体、薬浴区の 4 検体、さらに消化管が白濁している個体の 5 検体について、最適希釈平板上の全コロニーに番号をつけ、乱数表を用いて該当する番号のコロニーを 20~30 個釣菌し、純粋分離を行って供試菌株を得た。

#### 分離菌株の分類

分離菌株は絵面・清水 (1987) の方法により以下の形態学的性状及び生化学的性状を検査し、属レベルの分類を行った。

#### 形態学的性状

分離菌株を海水培地で 20°C、48 時間培養した後、常法通りグラム染色性、菌形、運動性、鞭毛の有無を観察した。

#### 生化学的性状

前記同様の培養菌体を供試し、OF 試験、塩類要求性試験、オキシダーゼ試験、カタラーゼ試験、DNA 分解性試験、ゼラチン分解性試験、カゼイン分解性試験、寒天分解性試験、芽胞染色試験、デンプン分解性試験、発光性試験を行って結果を観察した。

## 結 果

#### 幼生の飼育結果

ハナサキガニ幼生の飼育結果の概要を Table 1 に示した。1992 年は 2 月 27 日から飼育を開始し、4 月 10 日に取り揚げた。ゾエア 3 齢期に脱皮してから 3 日目の 3 月 15 日に、薬浴区では塩酸オキシテトラサイクリンによる薬浴を行った。対照区の生残率は 52.4% と薬浴区の生残率 72.6% より 20% 程度少なかった。白濁個体は対照区でごく少数出現したが、薬浴区では出現しなかった。1993 年は 3 月 1 日から飼育を開始し、4 月 8 日に取り揚げた。ゾエア 3 齢期に脱皮してから 3 日

Table 1. Results of seed production of Hanasakicrab in Akkeshi Station of Japan Sea-Farming Association.

Year	Group	Rearing period	Number of reared larvae	Date of treatment	Number of produced larvae	Survival rate (%)	Appearance of diseased larvae
1992	Control	Feb. 27-Apr. 10	50,000	Not treated	26,200	52.4	Few
1992	Treatment* <sup>1</sup>	Feb. 27-Apr. 10	50,000	Mar. 15	36,300	72.6	No
1993	Control	Mar. 1-Apr. 8	48,000	Not treated	24,200	50.4	A few
1993	Treatment <sup>1)</sup>	Mar. 1-Apr. 8	48,000	Mar. 18	33,600	70.0	Few

\*<sup>1</sup> Larvae were treated with oxytetracycline hydrochloride, 5 µg/ml overnight.

目の3月18日に、薬浴区では塩酸オキシテトラサイクリンによる薬浴を行った。対照区の生残率は50.4%と薬浴区の生残率70.0%より20%程度低かった。白濁個体は対照区で少数出現し、薬浴区でもごく少数出現した。

### 生菌数

飼育用水及び飼育水の生菌数を採水日とともに Table 2 に示した。飼育用水の生菌数は  $1.3 \times 10^2 \sim 9.3 \times 10^2$  CFU/ml の範囲で測定された。飼育水の生菌数は  $9.6 \times 10^3 \sim 1.2 \times 10^4$  CFU/ml の範囲であり、飼育用水の生菌数より1~2オーダー増加した。薬浴区の飼育水の生菌数は  $2.1 \times 10^3 \sim 2.2 \times 10^4$  CFU/ml の範囲であり、無処理区の飼育水の生菌数と大きな差は認められなかった。

餌料として用いた珪藻の生菌数を採取日とともに Table 3 に示した。生菌数は  $6.9 \times 10^7 \sim 1.8 \times 10^8$  CFU/g の範囲であった。

ハナサキガニ幼生の消化管を含む全体の生菌数を Table 4 に示した。対照区の生菌数は  $10^4 \sim 10^8$  CFU/g の範囲で測定された。薬浴区の生菌数も  $10^4 \sim 10^7$  CFU/g の範囲であり、2例を除き対照区の生菌数より少なかった。体表面を消毒した後の消化管の生菌数を Table 5 に示した。対照区の消化管の生菌数は  $10^5$  から  $10^7$  CFU/g に増加した。薬浴区の消化管の生菌数は  $10^3 \sim 10^7$  CFU/g で、対照区の生菌数より約1オーダー少なかった。白濁個体の消化管の生菌数は  $10^7 \sim 10^8$  CFU/g であり、同時期の正常個体の消化管の生菌数より1オーダー多かった。

Table 2. Viable bacterial counts of seawater for rearing (CFU/ml).

Sampling date	Sample		
	Filtrate sea water	Rearing water from tank	
		Control	Treated*1
Mar. 2, 1992	$1.3 \times 10^2$	NT*2	NT
Mar. 9, 1992	$1.5 \times 10^2$	NT	NT
Mar. 16, 1992	$9.3 \times 10^2$	NT	NT
Apr. 2, 1992	$3.1 \times 10^2$	$1.2 \times 10^4$	$2.1 \times 10^3$
Apr. 10, 1992	$2.4 \times 10^2$	NT	NT
Mar. 11, 1993	$4.0 \times 10^2$	NT	NT
Mar. 19, 1993	NT	$9.6 \times 10^3$	$1.7 \times 10^4$
Mar. 25, 1993	NT	$1.2 \times 10^4$	$2.2 \times 10^4$

\*1 See Table 1.

\*2 Not tested.

Table 3. Viable bacterial counts of *Thalassiosira* sp. for feed of Hanasakicrab larvae.

Sampling date	Viable bacterial counts (CFU/g)
Mar. 2, 1992	$1.2 \times 10^8$
Mar. 9, 1992	$6.9 \times 10^7$
Mar. 16, 1992	$1.2 \times 10^8$
Mar. 11, 1993	$1.8 \times 10^8$

Table 4. Viable bacterial counts of Hanasakicrab larvae.

Sampling date	Viable bacterial counts (CFU/g)	
	Control	Treated* <sup>1</sup>
Mar. 2, 1992	$4.7 \times 10^5$	NT* <sup>2</sup>
Mar. 9, 1992	$9.8 \times 10^5$	NT
Mar. 16, 1992	$1.6 \times 10^6$	$2.7 \times 10^6$
Apr. 2, 1992	$2.7 \times 10^8$	$2.8 \times 10^7$
Apr. 10, 1992	$1.7 \times 10^7$	$4.9 \times 10^6$
Mar. 11, 1993	$3.0 \times 10^6$	NT
Mar. 19, 1993	$9.5 \times 10^4$	$9.5 \times 10^4$
Mar. 25, 1993	$1.5 \times 10^7$	$6.8 \times 10^5$
Apr. 7, 1993	$1.1 \times 10^8$	$1.3 \times 10^7$

\*<sup>1</sup> See Table 1.\*<sup>2</sup> Not tested.

Table 5. Intestinal viable bacterial counts of Hanasakicrab larvae.

Sampling date	Viable bacterial counts (CFU/g)		
	Control	Treated* <sup>1</sup>	Diseased* <sup>2</sup>
Mar. 2, 1992	$4.7 \times 10^4$	NT* <sup>3</sup>	NT
Mar. 9, 1992	$7.0 \times 10^5$	NT	NT
Mar. 16, 1992	$5.9 \times 10^4$	$1.3 \times 10^5$	NT
Apr. 2, 1992	$8.3 \times 10^6$	$9.7 \times 10^5$	NT
Apr. 10, 1992	$1.3 \times 10^7$	$1.7 \times 10^5$	$4.2 \times 10^7$
Mar. 11, 1993	$9.9 \times 10^5$	NT	NT
Mar. 19, 1993	$2.2 \times 10^5$	$2.4 \times 10^4$	NT
Mar. 25, 1993	$7.4 \times 10^6$	$6.4 \times 10^3$	NT
Mar. 31, 1993	$2.7 \times 10^7$	$1.6 \times 10^7$	$5.9 \times 10^8$
Apr. 7, 1993	$7.3 \times 10^7$	$1.3 \times 10^6$	NT

\*<sup>1</sup> See Table 1.\*<sup>2</sup> Diseased larvae which showed cloudiness of intestine and mid-gut.\*<sup>3</sup> Not tested.

## 細菌叢

飼育用水から分離された細菌の各属の出現率を Table 6 に示した。1992 年の飼育初期において *Flavobacterium*, *Moraxella*, *Alteromonas*, *Pseudomonas* が細菌叢の主要な構成属であったが、4 月には *Flavobacterium*, *Vibrio* が細菌叢の主体を成した。1993 年は *Alteromonas*, *Pseudomonas*, *Alcaligenes* が細菌叢を構成する主要な細菌であった。

ハナサキガニ幼生の飼育に用いる珪藻、タラシオシラの細菌叢を Table 7 に示した。1992 年は *Moraxella*, *Vibrio*, *Alteromonas*, *Pseudomonas* が菌叢の主要な構成属であり、飼育用水とほぼ同様の細菌叢を示した。1993 年では *Vibrio* が主体をなし、飼育用水の細菌叢と異なっていた。

ハナサキガニ幼生の細菌叢を Table 8 に示した。1992 年は対照区で *Moraxella*, *Vibrio*,

Table 6. Bacterial flora of seawater for rearing.

Genus	Sampling date			
	1992/3/2	1992/3/16	1992/4/10	1993/3/11
Number of isolated strains	25	30	30	30
Number of examined strains	21	24	11	12
<i>Flavobacterium</i>	14.3%	0.0%	27.3%	0.0%
<i>Moraxella-Achromobacter</i>	19.0	33.4	0.0	0.0
<i>Cytophaga</i>	4.8	0.0	0.0	0.0
<i>Vibrio</i>	9.5	0.0	36.4	0.0
<i>Alteromonas</i>	23.8	37.5	9.1	16.7
<i>Pseudomonas</i>	19.0	29.2	9.1	16.7
<i>Alcaligenes</i>	4.8	0.0	9.1	33.3
<i>Bacillus</i>	0.0	0.0	9.1	0.0
Coryneforms	4.8	0.0	0.0	0.0
Unidentified	0.0	0.0	0.0	33.3

Table 7. Bacterial flora of *Thalassiosira* sp. for feed of Hanasakicrab larvae.

Genus	Sampling date		
	1992/3/2	1992/3/16	1993/3/11
Number of isolated strains	30	30	30
Number of examined strains	25	30	26
<i>Flavobacterium</i>	12.0%	0.0%	0.0%
<i>Moraxella-Achromobacter</i>	32.0	20.0	0.0
<i>Cytophaga</i>	0.0	0.0	0.0
<i>Vibrio</i>	12.0	16.7	57.7
<i>Alteromonas</i>	4.0	43.3	3.8
<i>Pseudomonas</i>	32.0	3.3	7.7
<i>Alcaligenes</i>	4.0	0.0	7.7
<i>Bacillus</i>	4.0	16.7	0.0
Coryneforms	0.0	0.0	0.0
<i>Aeromonas</i>	0.0	0.0	7.7
Unidentified	0.0	0.0	15.4

*Pseudomonas*, *Alcaligenes* が細菌叢の主体を成し、葉浴区ではこれらに加えて *Flavobacterium* が多く分離されたが、対照区と葉浴区の細菌叢に大きな違いは認められなかった。1993 年には対照区で *Vibrio* 属細菌が優勢となったが、葉浴区では *Vibrio* の他、*Alteromonas*, *Pseudomonas* 等多くの属の細菌が分離され、明瞭な違いが認められた。

ハナサキガニ幼生の消化管の細菌叢を Tables 9 および 10 に示した。1992 年 1993 年共に対照区で *Vibrio* が優勢であったが、葉浴区の初回葉浴直後には *Vibrio* が検出されず *Pseudomonas* が菌叢の主体を成した。しかし 4 月の葉浴区の菌叢は対照区と同様に *Vibrio* が優勢となった。白濁個

Table 8. Bacterial flora of Hanasakicrab larvae.

Genus	Sampling date						
	1992/3/2	1992/3/16		1992/4/10	1993/3/11	1993/3/25	
	Control	Control	Treated* <sup>1</sup>	Treated* <sup>1</sup>	Control	Control	Treated* <sup>1</sup>
Number of isolated strains	30	30	30	30	30	30	30
Number of examined strains	26	13	19	21	21	25	20
<i>Flavobacterium</i>	0.0%	7.7%	42.1%	33.3%	0.0%	0.0%	0.0%
<i>Moraxella-Achromobacter</i>	42.3	38.5	10.5	9.5	0.0	0.0	0.0
<i>Cytophaga</i>	0.0	0.0	10.5	0.0	0.0	0.0	0.0
<i>Vibrio</i>	19.2	15.4	0.0	47.6	85.7	100.0	55.0
<i>Ateromonas</i>	7.7	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	10.0
<i>Pseudomonas</i>	11.5	38.5	26.3	0.0	0.0	0.0	15.0
<i>Alcaligenes</i>	15.4	0.0	10.5	9.5	0.0	0.0	5.0
<i>Bacillus</i>	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Coryneforms	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
<i>Aeromonas</i>	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Unidentified	0.0	0.0	0.0	0.0	14.3	0.0	15.0

\*<sup>1</sup> See Table 1.

Table 9. Intestinal bacterial flora of Hanasakicrab larvae in 1992.

Genus	Sampling date					
	1992/3/2	1992/3/16		1992/4/10		
	Control	Control	Treated* <sup>1</sup>	Control	Treated* <sup>1</sup>	Diseased* <sup>2</sup>
Number of isolated strains	30	30	30	30	20	30
Number of examined strains	26	28	19	6	17	7
<i>Flavobacterium</i>	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	5.9%	0.0%
<i>Moraxella-Achromobacter</i>	0.0	0.0	16.7	0.0	5.9	0.0
<i>Cytophaga</i>	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
<i>Vibrio</i>	84.6	85.7	0.0	100.0	82.4	100.0
<i>Ateromonas</i>	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
<i>Pseudomonas</i>	0.0	0.0	83.3	0.0	0.0	0.0
<i>Alcaligenes</i>	11.5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
<i>Bacillus</i>	0.0	14.3	0.0	0.0	5.9	0.0
Coryneforms	3.8	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
<i>Aeromonas</i>	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Unidentified	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0

\*<sup>1</sup> See Table 1.

\*<sup>2</sup> See Table 5.



Table 10. Intestinal bacterial flora of Hanasakicrab larvae in 1993.

Genus	Sampling date				
	3/11 Control	3/25		3/31	
		Control	Treated* <sup>1</sup>	Control	Treated* <sup>1</sup>
Number of isolated strains	30	30	30	20	20
Number of examined strains	30	30	30	18	19
<i>Flavobacterium</i>	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
<i>Moraxella-Achromobacter</i>	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
<i>Cytophaga</i>	10.0	0.0	0.0	0.0	0.0
<i>Vibrio</i>	86.7	90.0	100.0	100.0	100.0
<i>Alteromonas</i>	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
<i>Pseudomonas</i>	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
<i>Alcaligenes</i>	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
<i>Bacillus</i>	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Coryneforms	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
<i>Aeromonas</i>	3.3	6.7	0.0	0.0	0.0
Unidentified	0.0	3.3	0.0	0.0	0.0

\*<sup>1</sup> See Table 1.

Table 11. Intestinal bacterial flora of diseased Hanasakicrab larvae in 1993.

Genus	Sampling date			
	3/26 Diseased	3/29 Diseased	3/31 Diseased	4/1 Diseased
Number of isolated strains	4	10	20	8
Number of examined strains	1	5	19	6
<i>Flavobacterium</i>	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
<i>Moraxella-Achromobacter</i>	0.0	0.0	0.0	0.0
<i>Cytophaga</i>	0.0	0.0	0.0	0.0
<i>Vibrio</i>	100.0	100.0	100.0	100.0
<i>Alteromonas</i>	0.0	0.0	0.0	0.0
<i>Pseudomonas</i>	0.0	0.0	0.0	0.0
<i>Alcaligenes</i>	0.0	0.0	0.0	0.0
<i>Bacillus</i>	0.0	0.0	0.0	0.0
Coryneforms	0.0	0.0	0.0	0.0
<i>Aeromonas</i>	0.0	0.0	0.0	0.0
Unidentified	0.0	0.0	0.0	0.0

体の細菌叢はすべて *Vibrio* が 100% を占めていた (Table 11)。

## 考 察

ハナサキガニ幼生飼育水の生菌数は  $10^2$  CFU/ml のオーダーで測定され、採取日による差は認められなかった。飼育水では  $10^3 \sim 10^4$  CFU/ml のオーダーであり、飼育水と 1~2 オーダーの差が認められた。これは餌料やハナサキガニ幼生などからもたらされたものと考えられる。対照区と薬浴区の生菌数に大きな差は認められず、塩酸オキシテトラサイクリンによる飼育水の生菌数の減少効果は顕著ではなかった。

ハナサキガニ幼生の消化管を含む全体の生菌数は、対照区で  $10^5 \sim 10^8$  CFU/g、薬浴区で  $10^5 \sim 10^7$  CFU/g と測定され、薬浴区で約 1 オーダー生菌数が減少した。消化管の生菌数は対照区で  $10^4 \sim 10^7$  CFU/g、薬浴区でも  $10^3 \sim 10^7$  CFU/g と数字上ほぼ同程度であったが、2 例を除き薬浴区の生菌数が低く、塩酸オキシテトラサイクリンの薬浴効果が認められた。

一方白濁個体の消化管内の生菌数は  $10^7 \sim 10^8$  CFU/g と測定され、同時期の対照区の生菌数が  $10^6 \sim 10^7$  CFU/g であったのに比べると約 1 オーダー多く、薬浴区の  $10^5 \sim 10^6$  CFU/g と比較すると 1~2 オーダー多かった。

ガザミ *Portunus trituberculatus* では、*Vibrio* sp. zoea に感染した幼生の消化管内生菌数が、正常個体の生菌数より 2~3 オーダー高いという報告があり (Suzuki et al. 1990)、ハナサキガニの白濁を呈して死亡する現象が *Vibrio* 属細菌により引き起こされている可能性が示唆された。

飼育水の細菌叢は *Flavobacterium*, *Moraxella*, *Alteromonas*, *Pseudomonas*, *Alcaligenes* 等が主要な構成属であったが、4 月にはいると *Vibrio* の占める割合が高くなった。餌料に用いる珪藻タラシオシラの場合、1992 年は飼育水とほぼ同様の細菌叢を示したが、1993 年には飼育水に出現した細菌の割合が減少し、*Vibrio* が多く出現し年度により細菌叢に違いが認められた。

ハナサキガニ幼生の消化管を含む細菌叢は、1992 年は *Moraxella*, *Vibrio*, *Pseudomonas* 等が主体を成し、1993 年は *Vibrio* が優勢であった。飼育水の細菌叢と比較すると、特に *Vibrio* の占める割合が高くなっていくことが大きく異なっていた。このことは Sugita et al. (1987) が沿岸甲殻類 7 種について、Suzuki et al. (1990) がガザミについて、外被の細菌叢は環境水の影響を受けると報告したことと反した。この原因として、これらの報告では外被のみの細菌叢を調査しているのに対して、本研究では外被および消化管の細菌叢を調査したため、生菌数の多い消化管の細菌叢が大きく影響した可能性が考えられる。

ハナサキガニ幼生の消化管内の細菌叢は、両年ともに *Vibrio* が優勢であった。したがって飼育水および餌料に用いた珪藻タラシオシラの細菌叢とは明らかに異なっていた。甲殻類の消化管内細菌叢については、Yasuda and Kitao (1980) がクルマエビについて *Pseudomonas* と *Vibrio* が、Sugita et al. (1987) も沿岸甲殻類 7 種について *Pseudomonas* と *Vibrio* が、さらに Suzuki et al. (1990) もガザミについて *Pseudomonas* と *Vibrio* が主体をなしていたと報告している。ハナサキガニの場合は、*Vibrio* が優勢でありやや異なっていたが、薬浴を行った区で *Pseudomonas* が主体となった場合もあり、大きく異なっていないものと考えられる。吉水ら (1980) はサクラマス *Oncorhynchus masou* およびシロサケ *Oncorhynchus keta* の卵及び稚魚の表面及び消化管の細菌叢を調査し、浮上稚魚までは飼育水や飼育餌料の細菌叢の影響を受けると報告している。また、Muroga et al. (1987) は、マダイ *Pagrus major* とクロダイ *Acanthopagrus schlegelii* の仔稚魚期の腸管内細菌叢を調査し、仔稚魚の腸管内細菌叢は環境由来ではなく餌料由来の細菌から形成されると報告している。さらに、Tanasomwang and Muroga (1988, 1989) もヒラメ *Paralichthys olivaceus*, クロソイ *Sebastes schlegelii*, トラフグ *Takifugu rubripes*, キジハタ *Epinephelus akaara*

について同様の報告を行っている。また、Suzuki et al. (1990) はガザミの消化管内細菌叢が、魚類と同じように餌由来の細菌から形成されると考察している。本研究で調査した範囲では、ハナサキガニ幼生の餌料として用いた珪藻の細菌叢とハナサキガニ幼生の消化管内細菌叢は大きく異なり、これらの報告とは異なる結果となった。しかしながらハナサキガニの種苗生産においてはアルテミア *Artemia salina* も給餌しており、アルテミアの細菌叢も調査する必要がある。同時期に日本栽培漁業協会宮古事業場で、ケガニ *Erimacrus isenbeckii* の種苗生産用餌料として用いたアルテミアの細菌叢は、その主体を *Vibrio* が占め (データは示していない)、厚岸事業場のアルテミアも同様とすると、ハナサキガニの消化管内細菌叢は餌料であるアルテミア由来で形成されたと考えられる。また、*Vibrio* はハナサキガニ幼生の消化管内における常在細菌である可能性もあり、Sugita et al. (1987) が考察したように、消化管内の低い pH や胆汁酸の影響及び嫌気的状况のために結果として *Vibrio* が主体をなしている可能性も考えられる。

ハナサキガニ幼生の全体の細菌叢は、薬浴を行うことにより *Vibrio* の出現率が減少したが、消化管の細菌叢は対照区、薬浴区ともに *Vibrio* の占める割合が高く、1992年には薬浴直後に *Vibrio* が出現しなくなる場合が観察されたものの、1993年には細菌叢を検討したすべての例で *Vibrio* の出現率が高く、細菌叢に明瞭な違いは認められなかったが、生菌数は薬浴区で少なかった。これらの結果から、塩酸オキシテトラサイクリンの薬浴によるハナサキガニ幼生の体表及び消化管内における *Vibrio* の減少効果が確認された。

ハナサキガニ幼生の種苗生産結果を対照区と薬浴区で比較すると、1992年、1993年ともに薬浴区の生残率が対照区を20%上回るとともに、白濁個体の出現も薬浴区で少ない傾向があり、塩酸オキシテトラサイクリンによる薬浴が幼生の生残率を高める効果が認められた。

消化管白濁個体は、消化管の生菌数がおおよそ  $10^8$  CFU/g と正常個体と比較して多いこと、塩酸オキシテトラサイクリンによる薬浴を行って生菌数を1~2オーダー下げると白濁個体が出現しなくなることなどから、ハナサキガニ幼生の消化管が白濁し死亡する現象は、ある種の細菌により引き起こされることが窺えた。また白濁個体の消化管内の細菌叢は *Vibrio* が100%であったことから、本疾病にある種の *Vibrio* 属細菌が関与しているものと考えられる。しかしながら、*Vibrio* 属細菌は消化管内の常在細菌である可能性もあり、今後本疾病の防除対策を検討するに際し、これら *Vibrio* 属細菌の種の同定と病原性の確認および感染経路の特定が必要であると考えられる。

## 謝 辞

本実験を進めるにあたり、種々のご配慮をいただいた(社)日本栽培漁業協会第二技術部今村茂生部長、ならびに試験の実施にあたりご協力いただいた厚岸事業場、宮古事業場の職員各位に心からお礼申し上げます。

## 文 献

- 絵面良男・清水 潮 (1990). 水質・微生物編. p. 9-20, 日本海洋学会 (編), 沿岸環境調査マニュアル II, 恒星社厚生閣, 東京.
- Muroga, K., Higashi, M. and Keitoku, H. (1987). The isolation of intestinal microflora of farmed Red seabream (*Pagrus major*) and Black seabream (*Acanthopagrus schlegelii*) at larval and juvenile stages. *Aquaculture*, 65, 79-88.
- Sugita, H., Ueda, R., Berger, L.R. and Deguchi, Y. (1987). Microflora in the gut of Japanese coastal

- crustacea. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **53**, 1647-1655.
- Suzuki, K., Muroga, K., Nogami, K. and Maruyama, K. (1990). Bacterial flora of cultured swimming crab (*Portunus trituberculatus*) larvae. *Fish Pathology*, **25**, 29-36.
- Tanasomwang, V. and Muroga, K. (1988). Intestinal microflora of larval and juvenile stages in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Fish Pathology*, **23**, 77-83.
- Tanasomwang, V. and Muroga, K. (1989). Intestinal microflora of Rockfish *Sebastes schlegeli*, Tiger puffer *Takifugu rubripes* and Red grouper *Epinephelus akaara* at their larval and juvenile stages. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **55**, 1371-1377.
- Yamamoto, H., Ezura, Y. and Kimura, T. (1982). Effects of antibacterial action of seawater on the viability of some bacterial species. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.*, **48**, 1427-1431.
- Yasuda, K. and Kitao, T. (1980). Bacterial flora in the digestive tract of prawns, *Penaeus japonicus* BATE. *Aquaculture*, **19**, 229-234.
- 吉水 守・木村喬久・坂井 稔 (1980). サケ科魚類の稚仔魚期における腸内細菌叢の形成時期について. 日水誌, **46**, 967-975.