HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	ケガニ幼生および種苗生産水槽の細菌叢に関する研究
Author(s)	渡辺, 研一; 福永, 辰廣; 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(3), 143-156
Issue Date	1998-12
Doc URL	http://hdl.handle.net/2115/24176
Type	bulletin (article)
File Information	49(3)_P143-156.pdf

Instructions for use

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

北 大 水 産 彙 報
49(3), 143-156, 1998.

ケガニ幼生および種苗生産水槽の細菌叢に関する研究

渡辺　研一[1)]・福永　辰廣[2)]・鎌田　研一[3)]
杉澤　輝文[3)]・吉水　　守[3)]

Bacterial Flora of Hatchery-reared Horsehair Crab Larvae

Ken-ichi WATANABE[1)], Tatsuhiro FUKUNAGA[2)], Ken-ichi KAMATA[3)]
Teruhumi SUGISAWA[3)] and Mamoru YOSHIMIZU[3)]

Abstract

Viable bacterial counts and bacterial flora of hatchery-reared Horsehair Crab (*Erimacrus isenbeckii*) larvae were investigated. The viable bacterial counts of larvae both external and intestinal were increased day by day from 10^5 to 10^8 CFU/g. In rearing water and *Thalassiosira* sp., feed for larvae, *Pseudomonas* and *Moraxella* consisted dominant groups, and *Artemia salina*, feed for larvae and intestine of larvae, *Vibrio* was dominant. It seemed that intestinal bacterial flora of larvae were influenced with the bacteria from *Artemia salina*. Mass mortality frequently occurred in cultured Horsehair Crab larvae. There was no typical symptoms of the dead larvae. But, some larvae showed melted spine.

By comparison with the bacterial flora of normal larvae, proportion of *Alteromonas* was high in bacterial flora of abnormal larvae with melted spine. Therefore, it is likely that some strains of *Alteromonas* spp. will be involved in an appearance of abnormal larvae in hatchery-reared Horsehair Crab.

Key words: Horsehair Crab, *Erimacrus isenbeckii*, Bacterial flora, *Artemia salina*, *Thalassiosira* sp.

緒　　言

ケガニ *Erimacrus isenbeckii* は北海道から太平洋側では小名浜にかけて，日本海側では鳥取県までの大陸棚に分布し，水深 10～200 m に生息する甲殻類で，重要な漁獲対象種となっているが，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) および宮古事業場では，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，毎年十万尾オーダーのメガロパを生産してきている。しかしながら，ゾエアからメガロパ期にかけて大量死が起こり，種苗の安定的な大量生産技術は確立されていない現状にある。

[1)] 日本栽培漁業協会厚岸事業場
(*Akkeshi Station of Japan Sea-Farming Association*)
[2)] 日本栽培漁業協会宮古事業場 (現：伯方島事業場)
(*Miyako Station of Japan Sea-Farming Association*)
[3)] 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*)

本研究では，ケガニ種苗生産過程での大量死の原因究明を行う上での基礎資料を得る目的で，ケガニ種苗生産で用いる飼育用水および餌料の細菌叢とケガニ幼生の体表，消化管の細菌叢を微生物生態学的に比較検討した。また，幼生の大量死に関与すると考えられる要因の一つに背額棘の溶解があげられ，正常個体と異常個体の棘の細菌叢についても検討したので報告する。

材料と方法

ケガニ幼生の飼育

ケガニ幼生は宮古事業場または厚岸事業場で養成中の親ガニからふ化したものを用いた。飼育水槽として 50, 100, 150 m^3 水槽を用意し，幼生の密度が 10,000 尾/m^3 程度となるようにふ化直後のゾエアを収容した。餌料として珪藻 *Thalassiosira* sp. をゾエア 5 齢期までと，アルテミア *Artemia salina* のノープリウスを取り揚げまで給餌した。取り揚げはメガロパ期の中期に行った。

供試飼育用水

1992 年と 1993 年の宮古事業場における種苗生産水槽に供給するろ過海水を種苗生産過程に沿って合計 11 回，飼育水槽への給水管から滅菌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 13 回，滅菌試験管を用いて直接採取した。

供試飼育用餌料

1992 年と 1993 年の宮古事業場におけるケガニ幼生用餌料として培養中の *Thalassiosira* sp. を計 6 回，*A. salina* を計 9 回，それぞれ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。アルテミアはふ化水槽に収容する前の卵を次亜塩素酸ナトリウム (25 mg/l) で 15 分間処理した後，紫外線処理海水でふ化させたものと，処理せずにろ過海水でふ化させたものについて，それぞれふ化直後と給餌前に採取した。

供試ケガニ

1992 年と 1993 年のケガニ幼生について，宮古事業場におけるふ化直後のものを 5 回，宮古事業場における種苗生産過程のものを計 24 回，それぞれ採取した。背額棘の異常個体と正常個体の細菌叢を比較するために，厚岸事業場において種苗生産過程のものを 1 回採取した。

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ケガニの体表（消化管を含む）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。さらに供試ケガニ幼生の一部については，Muroga et al. (1987) の方法により，滅菌ステンレス茶こしに供試ケガニを取り 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。背額棘については，顕微鏡により正常個体と異常個体を選別し，それぞれの棘のみを 50 尾分ずつ採取して体表試料と同様に処理した。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 日間好気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 1ml 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8検体，餌料は4検体，ケガニ幼生ではふ化直後の試料で5検体，種苗生産過程の試料で22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30～40個宛釣菌し，純粋分離後，供試菌株を得た。なお，最適希釈平板のコロニー数が30に満たない場合は全てを釣菌し，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 (1990) の方法により以下の形態学的性状およ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

ケガニ幼生の飼育結果の概要をTable 1に示した。宮古事業場で試料を採取した幼生の飼育期間は，3月中旬から5月上旬までのおよそ2ヶ月間，厚岸事業場で試料を採取した幼生の飼育期間は，3月中旬から4月下旬までのおよそ1ヶ月半であった。宮古事業場における生残率は0～11%の範囲，厚岸事業場における生残率は2.3%であった。

Table 1. Results of seed production of Horsehair Crab used for this experiments.

Year	Site	Group	Rearing period	Number of reared larvae (ind.*1)	Number of produced larvae (ind.)	Survival rate (%)
1992	Miyako	No. 1	Mar. 10-May 3	400,000	0	0.0
1992	Miyako	No. 2	Mar. 24-May 4	400.000	0	0.0
1992	Miyako	No. 3	Mar. 27-May 13	1,000,000	2,200	0.2
1993	Miyako	No. 1	Mar. 23-May 7	600,000	46,000	7.7
1993	Miyako	No. 2	Mar. 24-May 7	600,000	45,000	7.5
1993	Miyako	No. 3	Mar. 25-May 9	600,000	66,000	11.0
1993	Miyako	No. 4	Mar. 26-May 11	600,000	36,000	6.0
1993	Akkeshi		Mar. 14-Apr. 26	500,000	11,300	2.3

*1 Individual.

生菌数

宮古事業場における飼育用水およ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 1.5×10^2～2.5×10^3 CFU/ml の範囲であった。飼育水の生菌数は 1.3×10^4～8.5×10^4 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。

宮古事業場で餌料として用いた *Thalassiosira* sp. および *A. salina* の生菌数を採取日とともに Table 3 に示した。*Thalassiosira* sp. の生菌数は 4.3×10^6～4.5×10^8 CFU/g の範囲であった。ふ化直後の *A. salina* の生菌数は次亜塩素酸ナトリウムで処理した場合に 6.9×10^6～1.0×10^8 CFU/g の範囲，通常の場合に 8.6×10^7～1.1×10^8 CFU/g の範囲であり，処理した場合に生菌数が減少する例が観察された。給餌前の *A. salina* の生菌数は次亜塩素酸ナトリウムで処理した場合に 3.3×10^8 CFU/g, 通常の場合に 2.4×10^4～2.5×10^8 CFU/g の範囲であり，処理した場合にむしろ生菌数が増加する傾向が認められた。

宮古事業場におけるケガニ幼生の消化管を含む全体の生菌数を Table 4 に示した。ふ化直後の幼生の生菌数は 3.5×10^5～2.2×10^6 CFU/g の範囲であった。種苗生産過程の生菌数は飼育日数の経過とともに増加し，その後取り揚げ時期に減少する傾向が認められ，1.3×10^5～4.7×10^8 CFU/g の範囲で測定された。

宮古事業場におけるケガニ幼生の体表面を消毒した後の消化管の生菌数を Table 5 に示した。ふ化直後の幼生の生菌数は 4.0×10^4～2.8×10^5 CFU/g の範囲であり，消化管を含む全体の生菌数より 1 オーダー低かった。種苗生産過程の生菌数は 9.0×10^2～5.4×10^7 CFU/g の範囲であり，飼育日数の経過とともに増加する傾向が認められ，消化管を含む全体で観察された取り揚げ時期の生菌数の減少は確認されなかった。また，全体の生菌数と消化管の生菌数は，飼育の初期に 1～3 オーダー，飼育の後期にはほぼ同数か 1 オーダーの違いが認められた。

厚岸事業場で種苗生産過程のケガニ幼生のうち背額棘が溶解している異常個体と正常個体の生菌数を Table 6 に示した。両試料とも 10^5 CFU/g オーダーで生菌数が測定され，異常個体で生菌数

Table 2. Viable bacterial counts of seawater for rearing (CFU/ml) in the Miyako station.

Sampling date	Sample				
	Filtrated sea water	Rearing water from tank			
		No. 1	No. 2	No. 3	No. 4
Mar. 13, 1992	2.6×10^2	NT*1	NT	NT	NT
Mar. 18, 1992	6.4×10^2	NT	NT	NT	NT
Mar. 24, 1992	6.7×10^2	NT	NT	NT	NT
Apr. 7, 1992	8.2×10^2	NT	NT	NT	NT
Apr. 17, 1992	8.9×10^2	NT	NT	NT	NT
Apr. 24, 1992	2.8×10^2	8.5×10^4	NT	NT	NT
Apr. 28, 1992	1.5×10^2	NT	NT	NT	NT
May 8, 1992	5.0×10^2	NT	NT	NT	NT
Mar. 27, 1993	9.1×10^2	1.3×10^4	2.4×10^4	3.5×10^4	2.0×10^4
Apr. 20, 1993	8.8×10^2	1.9×10^4	1.3×10^4	1.6×10^4	2.0×10^4
Apr. 28, 1993	2.5×10^3	1.6×10^4	1.5×10^4	1.3×10^4	8.0×10^4

*1 Not tested.

Table 3. Viable bacterial counts of feed for Horsehair Crab larvae (CFU/g) in the Miyako station.

Sampling date	Sample				
		Artemia salina			
		Just hatched		Before fed	
	Thalassiosira sp.	Control	Teratment*1	Control	Treatment
Mar. 13, 1992	4.5×10^{6}	NT	NT	NT	NT
Mar. 18, 1992	4.3×10^{6}	NT	NT	NT	NT
Mar. 24, 1992	2.9×10^{7}	NT	NT	NT	NT
Apr. 7, 1992	NT*2	NT	NT	2.5×10^{8}	NT
Apr. 24, 1992	1.6×10^{8}	NT	NT	NT	NT
Apr. 28, 1992	NT	NT	NT	NT	NT
May 8, 1992	NT	NT	NT	2.0×10^{8}	NT
Mar. 27, 1993	4.6×10^{6}	8.6×10^{7}	6.9×10^{6}	NT	NT
Apr. 20, 1993	4.5×10^{8}	1.1×10^{8}	1.0×10^{8}	2.1×10^{7}	3.3×10^{8}
Apr. 28, 1993	NT	NT	NT	2.4×10^{4}	NT

*1 Eggs were treated with sodium hypochlolyte (25 mg/l) for 15 min and UV treated seawater was used for rearing water.
*2 Not tested.

Table 4. Viable bacterial counts of Horsehair Crab larvae (CFU/g) in the Miyako station.

Sampling date	Sample				
	Hatching tank	Rearing tank			
		No. 1	No. 2	No. 3	No. 4
Mar. 13, 1992	7.9×10^{5}	NT	NT	NT	NT
Mar. 18, 1992	6.7×10^{5}	1.1×10^{6}	NT	NT	NT
Mar. 24, 1992	3.5×10^{5}	8.6×10^{6}	1.3×10^{5}	NT	NT
Apr. 7, 1992	2.2×10^{6}	1.1×10^{7}	1.8×10^{7}	9.2×10^{6}	NT
Apr. 17, 1992	1.1×10^{6}	1.5×10^{7}	1.2×10^{6}	7.8×10^{6}	NT
Apr. 24, 1992	NT*1	1.2×10^{8}	8.0×10^{7}	7.5×10^{6}	NT
Apr. 28, 1992	NT	1.8×10^{7}	1.8×10^{7}	NT	NT
May 8, 1992	NT	NT	NT	2.2×10^{6}	NT
Mar. 27, 1993	NT	2.9×10^{6}	3.6×10^{5}	NT	NT
Apr. 20, 1993	NT	1.3×10^{8}	4.7×10^{8}	3.6×10^{8}	4.4×10^{8}
Apr. 28, 1993	NT	1.6×10^{7}	2.5×10^{7}	1.6×10^{7}	1.9×10^{7}

*1 Not tested.

Table 5. Viable intestinal bacterial counts of Horsehair Crab larvae (CFU/g) in the Miyako station.

Sampling date	Sample			
	Hatching tank	Rearing tank		
		No. 1	No. 2	No. 3
Mar. 13, 1992	4.0×10^3	NT*1	NT	NT
Mar. 18, 1992	9.0×10^3	1.4×10^4	NT	NT
Mar. 24, 1992	7.9×10^3	1.2×10^5	9.0×10^2	NT
Apr. 7, 1992	2.8×10^4	2.7×10^6	2.3×10^5	1.5×10^5
Apr. 17, 1992	1.6×10^4	1.3×10^6	1.8×10^5	9.8×10^4
Apr. 24, 1992	NT	1.5×10^7	3.7×10^6	1.5×10^5
Apr. 28, 1992	NT	5.4×10^7	1.7×10^7	NT
May 8, 1992	NT	NT	NT	1.9×10^5

*1 Not tested.

Table 6. Viable bacterial counts of Horsehair Crab larval spines (CFU/g) in the Akkeshi station.

Sampling date	Sample*1	
	Abnormal*2	Normal
Apr. 20, 1993	5.6×10^5	5.5×10^5

*1 Viable bacterial counts of spines were measured.
*2 Spines of the larvae were melted.

が多いといった傾向は認められなかった。

細菌叢

宮古事業場における飼育用水および飼育水から分離された細菌の各属の出現率を Table 7 に示した。飼育用水では 1992 年の 3 月は *Acinetobacter, Moraxella, Pseudomonas, Achromobacter* が細菌叢の主要な構成属であったが，4 月には *Moraxella, Cytophaga* が細菌叢の主体をなした。1993 年の 3 月は *Moraxella, Cytophaga* が細菌叢の主要な構成属であったが，4 月では *Vibrio* が細菌叢を構成する主要な細菌であった。飼育水では，*Vibrio* が細菌叢を構成する主要な細菌であった。

宮古事業場でケガニ幼生の飼育に用いた餌料 *Thalassiosira* sp. および *A. salina* の細菌叢を Table 8 に示した。*Thalassiosira* sp. では 1992 年は *Moraxella, Pseudomonas* が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。*A. salina* では次亜塩素酸ナトリウムで処理した試料もしない試料もともに *Vibrio* が主体をなした。

宮古事業場におけるふ化直後のケガニ幼生の細菌叢を Table 9 に示した。消化管を含む全体では，1992 年の 3 月は *Moraxella, Pseudomonas, Alcaligenes* が，4 月には *Moraxella, Cytophaga* が細菌叢の主体をなし，飼育用水の細菌叢とほぼ同様であった。1993 年では *Vibrio* が主体をなし，飼

Table 7. Bacterial flora of seawater for rearing in the Miyako station.

Genus	Sampling date							
	Seawater for rearing						Rearing water	
	Mar. 13, 1992	Mar. 24, 1992	Apr. 17, 1992	Mar. 8, 1993	Mar. 17, 1993	Apr. 17, 1993	Apr. 28, 1993	Apr. 28, 1993
Number of isolated strains	30	30	40	40	30	30	40	30
Number of examined strains	30	12	29	28	13	10	14	13
Flavobacterium	13.3%	8.3%	13.8%	10.7%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
Acinetobacter	20.0	0.0	0.0	0.0	7.7	0.0	0.0	0.0
Moraxella	26.7	50.0	24.1	28.6	15.4	0.0	14.3	0.0
Cytophaga	3.3	8.3	31.0	25.0	23.1	0.0	21.4	0.0
Vibrio	6.7	8.3	17.2	14.3	15.4	90.0	57.1	84.6
Alteromonas	3.3	0.0	6.9	10.7	0.0	0.0	0.0	0.0
Pseudomonas	23.3	0.0	0.0	0.0	7.7	0.0	0.0	0.0
Alcaligenes	3.3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Aeromonas	0.0	0.0	0.0	0.0	7.7	10.0	0.0	0.0
Achromobacter	0.0	25.0	3.4	10.7	0.0	0.0	7.1	0.0
Bacillus	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Micrococcus	0.0	0.0	0.0	0.0	7.7	0.0	0.0	0.0
Staphylococcus	0.0	0.0	0.0	0.0	7.7	0.0	0.0	0.0
Coryneforms	0.0	0.0	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	0.0	15.4

Table 8. Bacterial flora of feed for Horsehair Crab larvae in the Miyako station.

Genus	Sampling date			
	Thalassiosira sp.		*Artemia salina* (before fed)	
			Control	Treated*1
	Mar. 13, 1992	Mar. 17, 1993	Apr. 7, 1992	Apr. 20, 1993
Number of isolated strains	30	30	36	30
Number of examined strains	29	4	36	19
Flavobacterium	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
Acinetobacter	6.9	0.0	0.0	0.0
Moraxella	62.1	0.0	2.8	0.0
Cytophaga	0.0	25.0	11.1	0.0
Vibrio	0.0	75.0	72.2	84.2
Alteromonas	0.0	0.0	0.0	0.0
Pseudomonas	27.6	0.0	0.0	0.0
Alcaligenes	0.0	0.0	0.0	0.0
Aeromonas	0.0	0.0	0.0	10.5
Achromobacter	0.0	0.0	13.9	0.0
Bacillus	3.4	0.0	0.0	0.0
Micrococcus	0.0	0.0	0.0	0.0
Staphylococcus	0.0	0.0	0.0	0.0
Coryneforms	0.0	0.0	0.0	0.0
Unidentified	0.0	0.0	0.0	5.3

*1 See Table 3.

育用水の細菌叢と異なっていた。消化管では1992年の3月には *Moraxella*, *Vibrio* が，4月には *Moraxella*, *Alteromonas* が細菌叢の主体をなし，飼育用水の細菌叢と異なっていた。

宮古事業場で種苗生産過程のケガニ幼生の消化管を含む全体の細菌叢を Tables 10, 11 に示した。1992年には飼育の初期に *Moraxella*，後半になるにつれて *Vibrio* 属細菌が優勢となる傾向が認められた。1993年はサンプリング時期が飼育の後半のみであったが *Alteromonas* が細菌叢の主体をなしていた。

宮古事業場で種苗生産過程のケガニ幼生の消化管の細菌叢を Table 12 に示した。どの水槽でも飼育後半になると *Vibrio* が菌叢の主体をなした。

厚岸事業場で種苗生産過程のケガニ幼生のうち背額棘が溶解している個体と正常個体の細菌叢を Table 13 に示した。正常個体の細菌叢は *Vibrio* が主体をなしたのに対して，棘が溶解している個体の細菌叢は *Vibrio* と *Alteromonas* が主体であり，明らかに異なっていた。

考　　察

宮古事業場のケガニ幼生飼育用水の生菌数は 10^2～10^3 CFU/ml オーダーで測定され，採取日による顕著な差は認められなかった。また，厚岸事業場で同時期に測定されたハナサキガニ *Para-*

Table 9. Bacterial flora of just hatched Horsehair Crab larvae in the Miyako station.

Genus	Sampling date				
	External + Intestine			Intestine	
	Mar. 13, 1992	Apr. 7, 1992	Mar. 17, 1993	Mar. 13, 1992	Apr. 7, 1992
Number of isolated strains	30	36	30	8	36
Number of examined strains	29	16	4	7	16
Flavobacterium	10.3%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
Acinetobacter	3.4	0.0	0.0	0.0	0.0
Moraxella	17.2	56.2	0.0	42.9	31.3
Cytophaga	10.3	25.0	0.0	0.0	6.3
Vibrio	10.3	6.2	66.7	57.1	0.0
Alteromonas	10.3	0.0	0.0	0.0	56.2
Pseudomonas	20.7	12.5	0.0	0.0	0.0
Alcaligenes	17.2	0.0	0.0	0.0	6.3
Aeromonas	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Achromobacter	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Bacillus	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Micrococcus	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Staphylococcus	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Enterobacteriaceae	0.0	0.0	33.3	0.0	0.0
Coryneforms	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Unidentified	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0

lithodes brevipes 幼生飼育用水の生菌数（渡辺ら，1998）の測定結果と比較しても顕著な差は認められなかった。飼育水では 10^4 CFU/ml オーダーであり，飼育用水と 1～2 オーダーの差が認められた。これは餌料やケガニ幼生および通気などからもたらされたものと考えられる。

餌料として用いた *A. salina* の生菌数は，ふ化直後の *A. salina* で卵を次亜塩素酸ナトリウムで処理した場合に 10^6～10^8 CFU/g オーダー，通常の場合に 10^7～10^8 CFU/g オーダーで測定され，処理した場合に生菌数が減少する例が観察され，卵の消毒効果がうかがえた。しかしながら，実際に給餌する *A. salina* の生菌数は，処理した場合に 10^8 CFU/g オーダー，通常の場合に 10^4～10^8 CFU/g オーダーであり，処理した場合にむしろ生菌数が増加する傾向があり，消毒効果は認められなかった。したがって，給餌する *A. salina* の生菌数を減少させる目的のためには，他の方策をとる必要があると考えられた。

ケガニ幼生の消化管を含む全体の生菌数は，ふ化直後で 10^5～10^6 CFU/g であった。種苗生産過程の幼生では，10^5～10^8 CFU/g オーダーで測定され，ふ化直後から徐々に生菌数が増加した。また，飼育後半には生菌数が減少する傾向が認められたが，この要因は不明である。

ケガニ幼生の消化管内の生菌数はふ化直後の幼生で 10^3～10^4 CFU/g オーダーで測定され，消化管を含む全体の生菌数より 2 オーダー低かったことから，この時期のケガニの体表のみの生菌数は，10^2 CFU/g オーダーであることが推察された。種苗生産過程の幼生では 10^2～10^7 CFU/g オーダーで測定され，飼育日数の経過とともに増加する傾向が認められた。消化管を含む全体の

Table 10. Bacterial flora of Horsehair Crab larvae in 1992 (Miyako).

Genus	Sampling date								
	No. 1 tank			No. 2 tank			No. 3 tank		
	Mar. 24	Apr. 17	Apr. 28	Mar. 24	Apr. 17	Apr. 28	Apr. 7	Apr. 17	May 8
Number of isolated strains	30	40	40	30	40	40	36	40	40
Number of examined strains	17	13	9	7	31	13	23	26	31
Flavobacterium	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
Acinetobacter	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Moraxella	41.2	7.7	11.1	71.4	9.7	0.0	21.7	38.5	0.0
Cytophaga	0.0	0.0	22.2	0.0	0.0	0.0	0.0	15.4	0.0
Vibrio	47.1	38.5	22.2	0.0	67.7	69.2	34.8	15.4	90.3
Alteromonas	0.0	30.8	11.1	14.3	16.1	15.4	0.0	15.4	0.0
Pseudomonas	0.0	23.1	0.0	0.0	6.5	0.0	30.4	7.7	3.2
Alcaligenes	0.0	0.0	33.3	14.3	0.0	15.4	0.0	3.8	0.0
Aeromonas	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Achromobacter	11.8	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	13.0	3.8	6.5
Bacillus	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Micrococcus	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Staphylococcus	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Enterobacteriaceae	0.0	0.0	33.3	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	0.0	0.0
Unidentified	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0

Table 11. Bacterial flora of Horsehair Crab larvae in 1993 (Miyako).

Genus	Sampling date	
	No. 1 tank	No. 2 tank
	Apr. 28	Apr. 28
Number of isolated strains	33	31
Number of examined strains	32	31
Flavobacterium	0.0%	0.0%
Acinetobacter	0.0	0.0
Moraxella	0.0	0.0
Cytophaga	0.0	0.0
Vibrio	6.3	3.2
Alteromonas	75.0	71.0
Pseudomonas	0.0	0.0
Alcaligenes	12.5	9.7
Aeromonas	0.0	0.0
Achromobacter	0.0	0.0
Bacillus	0.0	0.0
Micrococcus	0.0	0.0
Staphylococcus	0.0	0.0
Enterobacteriaceae	0.0	0.0
Coryneforms	0.0	0.0
Unidentified	6.3	16.1

生菌数は飼育後半に減少する傾向が認められたが，消化管のみでは認められなかった。このことから，取り揚げ前のケガニ幼生では体表の生菌数が減少することがうかがえた。

飼育用水の細菌叢は1992年の3月では *Acinetobacter, Moraxella, Pseudomonas, Achromobacter* が細菌叢の主要な構成属であったが，4月には *Moraxella, Cytophaga* が細菌叢の主体を成した。1993年の3月は *Moraxella, Cytophaga* が細菌叢の主要な構成属であったが，4月では *Vibrio* が細菌叢を構成する主要な細菌であった。このことから，飼育用水の細菌叢は年度や時期により若干異なっていた。

飼育水では，*Vibrio* が細菌叢を構成する主要な細菌であり，同時期の飼育用水，餌料として給餌した *Thalassiosira* sp. および *A. salina* の細菌叢が *Vibrio* 主体であったことから，これらの影響を受けているものと考えられた。

ケガニ幼生の飼育に用いる *Thalassiosira* sp. の細菌叢は，1992年では *Moraxella, Pseudomonas* が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が，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。このことはハナサキガニの場合にも同様に観察され，年度により細菌叢に違いが認められた。

ふ化直後のケガニ幼生の消化管を含む全体の細菌叢は，1992年の3月は *Moraxella, Pseudomonas, Alcaligenes* が，4月には *Moraxella, Cytophaga* が主体をなし，飼育用水の細菌叢とほぼ同様であった。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) が種苗生産過程のガザミ *Portunus trituberculatus* について，体表の細菌叢は環境水の影響

Table 12. Intestinal bacterial flora of Horsehair Crab larvae in 1992 (Miyako).

Genus	Sampling date								
	No. 1 tank			No. 2 tank			No. 3 tank		
	Mar. 24	Apr. 17	Apr. 28	Mar. 24	Apr. 17	Apr. 28	Apr. 7	Apr. 17	May 8
Number of isolated strains	30	40	40	22	40	40	30	40	40
Number of examined strains	24	35	36	6	10	12	27	31	32
Flavobacterium	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
Acinetobacter	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Moraxella	50.0	0.0	5.8	66.7	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Cytophaga	0.0	0.0	0.0	16.7	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Vibrio	0.0	54.3	72.2	0.0	90.0	83.3	80.5	74.2	96.9
Alteromonas	41.7	5.7	2.8	16.7	0.0	16.7	0.0	0.0	3.1
Pseudomonas	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Alcaligenes	8.3	0.0	2.8	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Aeromonas	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Achromobacter	0.0	40.0	16.7	0.0	10.0	0.0	18.5	25.8	0.0
Bacillus	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Micrococcus	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Staphylococcus	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Enterobacteriaceae	0.0	0.0	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	0.0	0.0
Unidentified	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0

Table 13. Bacterial flora of Horsehair Crab larval spine in the Akkeshi station.

Genus	Sampling date	
	Abnormal*1	Normal
	Apr. 20, 1993	Apr. 20, 1993
Number of isolated strains	30	30
Number of examined strains	22	23
Flavobacterium	0.0%	0.0%
Acinetobacter	0.0	0.0
Moraxella	0.0	0.0
Cytophaga	4.5	0.0
Vibrio	40.9	95.7
Alteromonas	40.9	0.0
Pseudomonas	4.5	0.0
Alcaligenes	4.5	0.0
Aeromonas	0.0	4.3
Achromobacter	0.0	0.0
Bacillus	0.0	0.0
Micrococcus	0.0	0.0
Staphylococcus	0.0	0.0
Enterobacteriaceae	0.0	0.0
Coryneforms	0.0	0.0
Unidentified	4.5	0.0

*1 See Table 6.

を受けると報告したことと同様であった。しかしながら，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。これは，ハナサキガニの場合（渡辺ら，1998）と同様に，調査の対象が体表のみか，消化管を含む全体かの違いによるためと考えられ，本研究の調査対象が消化管も含んでいるため，生菌数の多い消化管の細菌叢が影響した可能性が考えられた。

種苗生産過程のケガニ幼生の消化管を含む全体の細菌叢は，1992年には飼育の初期に *Moraxella*，後半になるにつれて *Vibrio* 属細菌が優勢となる傾向が認められ，1993年はサンプリング時期が飼育の後半のみであったが *Alteromonas* が細菌叢の主体を成しており，飼育用水の細菌叢とは違いが認められた。これは，ふ化直後の幼生の1993年の場合と同様の原因によるものと考えられた。

ケガニ幼生の消化管の細菌叢は，いずれの水槽ともに飼育後半になると *Vibrio* が主体であった。これは，給餌した餌料のうちアルテミアでその細菌叢が *Vibrio* 主体であったことを考えると，餌料由来で細菌叢が形成されたことがうかがえた。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) が沿岸甲殻類7種について *Pseudomonas* と *Vibrio* が，Suzuki et al. (1990) がガザミについて *Pseudomonas* と *Vibrio* が主体をなしていたと報告している。ケガニの場合は，*Vibrio* が優勢でありやや異なっていたが，既報のいずれの種も *Vibrio* が主要な構成属の一つであり，大きく異なってはいないものと考えられる。また *Vibrio* はケ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や胆汁酸の影響および嫌

気的状況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。

背額棘の異常個体と正常個体の棘の生菌数を比較したところ，差が認められなかったが，細菌叢は正常個体で *Vibrio* が主体を成したのに対して，棘が溶解している個体の細菌叢は *Vibrio*, *Alteromonas* が主体を成し，明らかに異なっていた。このことから，背額棘の溶解を示す異常個体の出現にある種の *Alteromonas* が関係していることがうかがえた。しかしながら，ケガニの種苗生産技術は確立されているとはいえない現状にあることから，種苗生産過程における大量死の要因として細菌による疾病のみを疑うのではなく，飼育技術や餌料面の検討も必要であろう。

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，並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る。

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 schlegeli*) 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.

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.

渡辺研一・高橋　誠・鎌田研一・杉澤輝文・吉水　守 (1998). 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. 北大水産彙報, **49**, 59-69.