HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	オゾン処理海水で飼育したマツカワ稚魚の細菌叢
Author(s)	渡辺, 研一; 吉水, 守
Citation	北海道大學水産學部研究彙報, 51(1), 63-69
Issue Date	2000-03
Doc URL	http://hdl.handle.net/2115/24203
Type	bulletin (article)
File Information	51(1)_P63-69.pdf

Instructions for use

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

北 大 水 産 彙 報
51(1), 63-69, 2000.

オゾン処理海水で飼育したマツカワ稚魚の細菌叢

渡辺　研一[1)]・吉水　　守[2)]

Bacterial Flora of Hatchery-Reared Barfin Flounder Juveniles Reared by Ozone Treated Seawater

Ken-ichi WATANABE[1)] and Mamoru YOSHIMIZU[2)]

Abstract

Viable bacterial counts and bacterial flora of hatchery-reared barfin flounder (*Verasper moseri*) juveniles reared by ozone treated seawater were investigated. The level of viable bacterial counts on seawater agar on the skin and the intestines of juveniles were 10^3 CFU/cm^2 and 10^4 CFU/g, respectively. The level of viable bacterial counts in ozonated seawater, live feeds (rotifer and brine shrimp) were 10^0, 10^7 and 10^7 CFU/ml or g, respectively.

Among rotifer and brine shrimp, *Vibrio* and *Alteromonas* consisted in dominant groups. *Alteromonas*, *Pseudomonas*, *Alcaligenes* and *Vibrio* composed skin bacterial flora. The intestinal bacterial flora of barfin flounder juveniles was consisted by *Vibrio*.

Key words: Barfin flounder, *Verasper moseri*, Bacterial flora, Skin, Intestine

種苗生産過程における健康種苗の微生物叢の把握は，病原微生物による疾病発生時における疫学調査の基礎資料として，その原因究明のためにきわめて重要である。

海産魚介類の種苗生産過程における稚仔の細菌叢に関する研究は数多く見られ，Muroga et al. (1987) がマダイ *Pagrus major* およびクロダイ *Acanthopagrus schlegeli* で，Tanasomwang and Muroga (1988, 1989) がヒラメ *Paralichthys olivaceus*，クロソイ *Sebastes schlegeli*，トラフグ *Takifugu rubripes* およびキジハタ *Epinephelus akaara* で，吉水ら (1999) がヒラメで，Suzuki et al. (1990) がガザミ *Portunus trituberculatus* で，渡辺ら (1998a, b) がハナサキガニ *Paralithodes brevipes* およびケガニ *Erimacrus issenbeckii* について報告している。

(社) 日本栽培漁業協会厚岸事業場 (以下当事業場とする) では，マツカワの種苗生産に関する技術開発を行っているが，その種苗生産過程でウイルス性神経壊死症が発生し (渡辺ら, 1999)，その防除対策の一環としてオゾン処理した海水を用いて種苗生産を行っている (Watanabe et al., 1998)。このオゾン処理海水を用いた種苗生産過程における稚魚の細菌叢に関する報告は見あたらない。本研究では，オゾン処理海水を用いた種苗生産過程のマツカワ仔稚魚の細菌叢を把握することを目的に，飼育用水および餌料生物を含め細菌学的な検討を行った。

[1)] 日本栽培漁業協会厚岸事業場
(*Akkeshi Station of Japan Sea-Farming Association*)
[2)] 北海道大学水産学部生物化学工学講座微生物学研究室
(*Laboratory of Biochemical Process Technology, Faculty of Fisheries, Hokkaido University*)

材料と方法

供試魚

オゾンと海水中の微量成分が反応して生成されるオキシダント濃度が0.5 mg/lとなるように海水にオゾンを吹き込み，5分間反応させた後，活性炭によりオキシダントを除去したオゾン処理海水（吉水・日向，1994）を用いて，当事業場で養成中の親魚から人工授精により得られた受精卵をふ化させて得た仔魚を飼育した。1998年5月8日にふ化後2日目の仔魚を0.5 m^3 ポリエチレン水槽に4,500尾収容し，成長にあわせてシオミズツボワムシ *Brachionus plicatilis*（ふ化後10〜31日目），アルテミア *Artemia salina*（ふ化後26日目〜取り揚げ）および配合飼料（ふ化後69日目〜）を適宜給餌した。換水は飼育開始当初から行い，0.1〜3回転/日と成長にあわせて適宜増加させた。水温は収容直後には受精卵のふ化管理水温である8°Cとし，その後1°C/3日の間隔で14°Cまで上昇させた。その後は，試験に供するまで14°Cを維持した。ふ化後77日目（1998年7月22日）に一度稚魚を取り揚げて生残尾数を計数した。生残した稚魚の内600尾を別の水槽に収容し，オゾン処理海水を用いて配合飼料を給餌してふ化後107日目（1998年8月21日）まで飼育した。平均全長50 mmの稚魚を供試して，下記の方法で体表，筋肉および腸管の生菌数を測定した。

飼育用水

上述の通りオゾン処理した飼育用海水を1998年8月25日に飼育水槽へ注水中の蛇口から無菌的に滅菌中試験管にとり，下記の方法で生菌数を測定した。

生物餌料

マツカワの成長にあわせて種苗生産に使用中のシオミズツボワムシ（ふ化後10〜31日目）あるいはアルテミア（ふ化後26日目〜取り揚げ）を供試した。1998年6月23日にワムシ，アルテミアともに40 μm メッシュの網を用いて採取し，下記の方法で生菌数を測定した。

試料の採取と生菌数の測定法

オゾン処理海水は10 mlを滅菌した0.45 μm フィルター（ミリポア，HA）でろ過し，そのフィルターを海水培地（Yamamoto et al., 1982）平板に張り付けて5日間好気的に培養し，出現コロニー数から海水1 mlあたりの生菌数を測定した。

ワムシおよびアルテミアは，無菌的にストマッカー用滅菌ポリ袋（オルガノ）に移し，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（オルガノ）でホモジナイズした。ホモジナイズ後，10倍希釈液列を作製して海水培地平板に塗抹し，20°Cで7日間好気的に培養した。出現コロニー数から常法にしたがい，試料1 gあたりの生菌数を算出した。

マツカワの体表試料はふ化後107日目に5尾から採取した。個体ごとに1 cm^2 の窓をあけた滅菌アルミ箔を張り付けて表皮を滅菌メスで切り取り，滅菌ポリ袋に入れ，1 mlの滅菌75% Herbst人工海水を加えてストマッカーでホモジナイズした。ホモジナイズ後，10倍希釈液列を作製して海水培地平板に塗抹し，20°Cで7日間好気的に培養した。出現コロニー数から常法にしたがい，体表1 cm^2 あたりの生菌数を算出した。表皮を切り取る際に微量の筋肉の付着が避けられないため，筋肉の生菌数も以下の方法で測定した。すなわち，別の3個体の体表をMuroga et al. (1987) の方法で消毒し，無菌的に表皮を剝いだ後，筋肉のみを滅菌メスと滅菌ピンセットで切り出し，滅菌ポリ袋に入れて試料を秤量後ストマッカーでホモジナイズした。9倍量の滅菌75% Herbst人工海水を加え，再度ホモジナイズした。その10倍希釈液列を作製し，前述と同様に筋肉1 gあたり

の生菌数を測定した。また，ホモジナイズした筋肉を1白金耳量採取し，直接海水培地平板に塗抹した。

マツカワ腸管試料は，上記の方法で体表の消毒を行った稚魚5尾の腸管全体を無菌的に採取し，秤量後ホモジナイズした。体表および筋肉と同様にして培養し，腸管1gあたりの生菌数として測定した。

細菌叢の検討

生菌数測定に供試した最適希釈平板上の全コロニーあるいは30コロニーを無作為に抽出し，純粋分離を行って供試菌株を得た。マツカワ体表および腸管試料については3尾を，餌料についてはワムシおよびアルテミア各1試料について細菌叢を調査した。オゾン処理海水および筋肉については，コロニー数がゼロあるいは少なかったため釣菌できなかった。

細菌叢は絵面・清水 (1990) の方法にしたがい，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。形態学的性状については，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。生化学的性状については前述と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

マツカワの飼育結果

飼育開始時に平均全長5.8 mmであったふ化仔魚は77日後に24.7 mmまで成長した。生残尾数は3,175尾となり，生残率は70.6%であった。この中で600尾をふ化後107日目まで継続飼育したところ，平均全長約50 mmまで成長し，生残尾数は505尾（生残率84.2%）であった。

飼育用水および餌料の生菌数

マツカワの飼育用オゾン処理海水および餌料のワムシあるいはアルテミアの生菌数をTable 1に示した。飼育用水の生菌数は4.8×10^0 CFU/ml，餌料ではワムシが8.1×10^7 CFU/g，アルテミ

Table 1. Viable bacterial counts of seawater and feeds for barfin flounder.

Group	Viable bacterial counts (CFU/ml or g)
Ozone treated seawater	4.8×10^0
Rotifer	8.1×10^7
Brine shrimp	9.4×10^7

Table 2. Viable bacterial counts of skin and intestine of barfin flounder.

Materials	Viable bacterial counts (CFU/cm² or g)				
	No. 1	No. 2	No. 3	No. 4	No. 5
Skin	3.4×10^3	3.4×10^3	5.6×10^3	3.1×10^3	3.2×10^3
Intestine	4.3×10^4	4.3×10^4	9.1×10^4	7.8×10^4	6.5×10^4

アでは 9.4×10^7 CFU/g と測定された。

マツカワの体表および腸管の生菌数

マツカワの体表および腸管の生菌数を Table 2 に示した。体表試料の生菌数は $3.1\sim5.6\times10^3$ CFU/cm^2 の範囲で測定され，個体間に大きな差は認められなかった。また筋肉試料からはコロニーは見られなかった。腸管試料の生菌数は $4.3\sim9.1\times10^4$ CFU/g の範囲で測定され，大きな個体差は認められなかった。

餌料生物の細菌叢

マツカワの飼育用餌料生物，ワムシとアルテミアの細菌叢を Table 3 に示した。ワムシでは *Vibrio* と *Alteromonas*, *Cytophaga* が，アルテミアでは *Vibrio* と *Alteromonas*, *Alcaligenes* が主体をなしていた。

体表の細菌叢

マツカワ体表の細菌叢を Table 4 に示した。調査した 3 尾共に *Alteromonas* が主体をなし，*Pseudomonas* と *Alcaligenes* あるいは *Vibrio* が検出された。

腸管の細菌叢

調査したマツカワ 3 尾の腸管の細菌叢を Table 5 に示した。いずれも *Vibrio* が 93.3～96.7% と優勢をなしていた。

Table 3. Bacterial flora of rotifer and brine shrimp, feeds for barfin flounder.

Genus	Rotifer		Brine shrimp	
	Strain	proportion (%)	Strain	proportion (%)
Number of isolated strains	30		30	
Number of examined strains	30		30	
Flavobacterium	0	0.0	0	0.0
Acinetobacter	0	0.0	0	0.0
Moraxella	0	0.0	0	0.0
Cytophaga	3	10.7	0	0.0
Vibrio	16	53.3	18	60.0
Alteromonas	9	30.0	6	20.0
Pseudomonas	1	3.3	2	6.7
Alcaligenes	1	3.3	4	13.3
Aeromonas	0	0.0	0	0.0
Achromobacter	0	0.0	0	0.0
Bacillus	0	0.0	0	0.0
Micrococcus	0	0.0	0	0.0
Staphylococcus	0	0.0	0	0.0
Enterobacteriaceae	0	0.0	0	0.0
Coryneforms	0	0.0	0	0.0
Unidentified	0	0.0	0	0.0

Table 4. Skin bacterial flora of barfin flounder reared by ozone treated seawater.

Genus	No. 1		No. 2		No. 3	
	Strain	Proportion (%)	Strain	Proportion (%)	Strain	Proportion (%)
Number of isolated strains	30		30		30	
Number of examined strains	30		30		30	
Flavobacterium	1	3.3	0	0.0	0	0.0
Acinetobacter	2	6.7	0	0.0	2	6.7
Moraxella	2	6.7	0	0.0	1	3.3
Cytophaga	0	0.0	0	0.0	0	0.0
Vibrio	1	3.3	3	10.0	2	6.7
Alteromonas	16	53.3	24	80.0	18	60.0
Pseudomonas	4	13.3	3	10.0	6	20.0
Alcaligenes	4	13.3	0	0.0	1	3.3
Aeromonas	0	0.0	0	0.0	0	0.0
Achromobacter	0	0.0	0	0.0	0	0.0
Bacillus	0	0.0	0	0.0	0	0.0
Micrococcus	0	0.0	0	0.0	0	0.0
Staphylococcus	0	0.0	0	0.0	0	0.0
Enterobacteriaceae	0	0.0	0	0.0	0	0.0
Coryneforms	0	0.0	0	0.0	0	0.0
Unidentified	0	0.0	0	0.0	0	0.0

Table 5. Intestinal bacterial flora of barfin flounder reared by ozone treated seawater.

Genus	No. 1		No. 2		No. 3	
	Strain	Proportion (%)	Strain	Proportion (%)	Strain	Proportion (%)
Number of isolated strains	30		30		30	
Number of examined strains	30		30		30	
Flavobacterium	0	0.0	0	0.0	0	0.0
Acinetobacter	0	0.0	0	0.0	0	0.0
Moraxella	0	0.0	0	0.0	0	0.0
Cytophaga	0	0.0	0	0.0	0	0.0
Vibrio	29	96.7	28	93.3	28	93.3
Alteromonas	1	3.3	2	6.7	2	6.7
Pseudomonas	0	0.0	0	0.0	0	0.0
Alcaligenes	0	0.0	0	0.0	0	0.0
Aeromonas	0	0.0	0	0.0	0	0.0
Achromobacter	0	0.0	0	0.0	0	0.0
Bacillus	0	0.0	0	0.0	0	0.0
Micrococcus	0	0.0	0	0.0	0	0.0
Staphylococcus	0	0.0	0	0.0	0	0.0
Enterobacteriaceae	0	0.0	0	0.0	0	0.0
Coryneforms	0	0.0	0	0.0	0	0.0
Unidentified	0	0.0	0	0.0	0	0.0

考　　察

飼育用水の生菌数が 4.8×10^0 CFU/ml であったにもかかわらずマツカワの体表からは 3.1～5.6×10^3 CFU/cm^2 の生菌数が測定され，その菌叢は *Alteromonas* が主体をなし，*Pseudomonas* と *Alcaligenes* あるいは *Vibrio* が検出された。今回飼育用水の生菌数が少なく細菌叢の調査ができなかったが，伊藤ら (1996) が当事業場のオゾン処理海水の細菌叢を調査したところ，3 回調査したいずれの場合も *Alteromonas* 属細菌がオゾン処理海水の細菌叢の主体をなしていたことから，体表の細菌叢は飼育用水の細菌叢の影響を受けているものと考えられる。海産魚類仔稚魚の体表の細菌叢については吉水ら (1999) がヒラメについて，甲殻類では Suzuki et al. (1990) がガザミについて，渡辺ら (1998a, b) がハナサキガニおよびケガニについて報告している。ヒラメとガザミでは環境水由来細菌により体表の細菌叢が形成されると報告されている。また，吉水ら (1980) は，シロサケ *Onchorhyncus keta* およびサクラマス *O. masou* 稚魚の表面の細菌叢を調査し，飼育用水に影響を受けることを報告している。

一方腸管の生菌数は 4.3～9.1×10^4 CFU/g の範囲で，マダイ，クロダイ，ヒラメ，クロソイ，トラフグおよびキジハタ等の他魚種の報告 (Muroga et al., 1987 ; Tanasomwang and Muroga, 1988, 1989 ; 吉水ら，1999) で $10^{1\sim7}$ CFU/g の範囲であったことと比較して少ない値を示した。しかし，その細菌叢は *Vibrio* が 93% 以上と圧倒的優勢をなし，*Alteromonas* と *Vibrio* が主体をなしたワムシおよびアルテミアの細菌叢を構成する細菌のうち *Vibrio* 属細菌が選択的に定着したものと考えられる。Muroga et al. (1987) は，マダイおよびクロダイの種苗生産過程の飼育用水，餌料および仔稚魚の細菌叢を比較し，仔稚魚の消化管の細菌叢は発育初期に環境や餌料に影響を受けるものの，その後消化管内の状態により細菌が選択されて形成されることを報告している。一方，Tanasomwang and Muroga (1988, 1989) はヒラメ，クロソイ，トラフグおよびキジハタの飼育用水，餌料および仔稚魚の細菌叢を比較して，仔稚魚の消化管の細菌叢は質的にも量的にも餌料から形成されることを報告している。しかし，配合飼料の主体をなした *Acinetobacter* やグラム陽性菌は消化管内で定着できないため，配合飼料給餌後のヒラメの消化管からは出現しなかったと報告している。また，吉水ら (1999) は *Bacillus* 属細菌が細菌叢の主体を成す配合飼料を給餌したヒラメ消化管の細菌叢が *Vibrio* 属細菌主体であったことを報告している。

さらに吉水ら (1980) は，シロサケおよびサクラマス稚魚の腸内細菌叢形成は消化管が機能化し，胃酸および胆汁酸が分泌され，これらによる選択と腸管内の嫌気度が大きく影響していることを報告している。ヒラメでは着底期のふ化後 31～40 日に胃と腸が明確に分化すると共に胃腺層が形成され (安永，1972) 消化管が機能化する。以上のことから，マツカワでも着底期以降に消化管の環境により餌料生物と共に入った細菌が選択され *Vibrio* 属細菌が腸管内細菌の主体をなすようになったと考えられる。しかし，マツカワの腸内細菌叢の形成時期と，その際の生菌数および消化管の機能化時期等に関しては，今後明らかにすべき課題と考える。

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.

伊藤慎悟・吉水　守・呉　明柱・日向進一・渡辺研一・早川　豊・絵面良男 (1996). 海水のオゾン処理による飼育水の殺菌効果とヒラメ (*Paralichthys olivaceus*) およびマツカワ (*Verasper moseri*) の生存率に及ぼす影響. 水産増殖，**44**, 457-463.

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

stage. *Aquaculture*, **65**, 79-88.

Suzuki, K., Muroga, K., Nogami, K. and Maruyama, K. (1990). Bacterial flora of cultured swimming crab (*Portunus trituberculatus*) larvae. *Fish Pathol.*, **25**, 29-36.

Tanasomwang, V. and Muroga, K. (1988). Intestinal microflora of larval and juvenile stages in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Fish Pathol.*, **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.

Watanabe, K., Suzuki, S., Nishizawa, T., Suzuki, K., Yoshimizu, M. and Ezura, Y. (1998). Control strategy for viral nervous necrosis of barfin flounder. *Fish Pathol.*, **33**, 445-446.

渡辺研一・高橋　誠・鎌田研一・杉澤輝文・吉水　守 (1998a). 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.

渡辺研一・福永辰廣・鎌田研一・杉澤輝文・吉水　守 (1998b). ケガニ幼生および種苗生産水槽の細菌叢に関する研究. 北大水産彙報, **49**, 143-156.

渡辺研一・石間正浩・川真田憲治・吉水　守・絵面良男 (1999). マツカワにおけるウイルス性神経壊死症の発生. 北大水産彙報, **50**, 101-113.

Yamamoto, H., Ezura, Y., and Kimura, T. (1982). Effects of antibacterial action of seawater on the viability of some bacterial species. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **48**, 1427-1431.

安永義暢 (1972). ヒラメ稚仔消化器官の発達について. 東海水研報, **69**, 75-89.

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.

吉水　守・日向進一 (1992). 養魚用水の殺菌法—紫外線およびオゾンの利用—. 工業用水, **404**, 2-8.

吉水　守・石川香織・河野和子・岩山奈央・木村喬久 (1999). 種苗生産施設におけるヒラメ稚仔魚の細菌叢. 北大水産彙報, **50**, 193-200.