



Title	種苗生産施設におけるヒラメ稚仔魚の細菌叢
Author(s)	吉水, 守; YOSHIMIZU, Mamoru; 石川, 香織 他
Citation	北海道大學水産學部研究彙報, 50(3), 193-200
Issue Date	1999-12
Doc URL	<a href="https://hdl.handle.net/2115/24196">https://hdl.handle.net/2115/24196</a>
Type	departmental bulletin paper
File Information	50(3)_P193-200.pdf



## 種苗生産施設におけるヒラメ稚仔魚の細菌叢

吉水 守<sup>\*1,2</sup>・石川 香織<sup>\*1</sup>・河野 和子<sup>\*1,2</sup>  
岩山 奈央<sup>\*1,2</sup>・木村 喬久<sup>\*1,2</sup>

## Bacterial Flora of Hatchery Reared Japanese Flounder

Mamoru YOSHIMIZU<sup>\*1</sup>, Kaori ISHIKAWA<sup>\*1</sup>, Kazuko KONO<sup>\*1</sup>,  
NaO IWAYAMA<sup>\*1</sup> and Takahisa KIMURA<sup>\*1</sup>

### Abstract

Viable bacterial counts and bacterial flora in hatchery-reared Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*), their rearing water and their diet were investigated. Viable bacterial counts in rearing water, a rotifer (*Branchionus plicatilis*), *Artemia salina* and a commercial pellet fed to larvae were  $10^4$  to  $10^5$ ,  $10^7$ ,  $10^8$ , and  $10^5$  CFU/ml (or g), respectively. The counts changed little during the investigation. The counts in larval and juvenile flounder ranged from  $10^4$  to  $10^8$  CFU/g. In rearing water, *Flavobacterium*, *Acinetobacter* and *Moraxella* were the dominant groups. In the diet for flounder, *Flavobacterium*, *Moraxella* and *Alteromonas*, *Vibrio*, and gram-positive bacteria were dominant in the rotifer, *A. salina* and in the artificial pellet, respectively. *Vibrio* was the dominant bacterial groups both throughout the entire body and in the digestive tract of larvae and juveniles. The intestinal bacterial flora in larvae was influenced by the bacterial flora in their rearing water and in their diet. When flounder reached the juvenile stage, *Vibrio* becomes dominant.

**Key words:** bacterial flora, Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*, hatchery, *Artemia salina*, rotifer

### 結 言

魚類の正常腸内細菌叢を明らかにすることはその生理的意義を明らかにする上で、また魚類の疾病研究においても極めて重要と考えられる。ヒラメは日本において重要な養殖魚であるが、稚仔魚期に大量死を伴う疾病に感染することが多く(西岡ら, 1997), ヒラメ種苗生産過程における飼育用水, 餌料生物および健康種苗の細菌叢の把握は, 種苗の大量死亡時における原因究明を行う上で, 微生物学的調査の基礎資料として極めて重要である。

本研究では, 日本栽培漁業協会宮古事業場を調査対象にヒラメ健康種苗の細菌叢の把握を目的に, 飼育用水および餌料生物を含めた飼育水槽の細菌叢とヒラメ種苗の細菌叢を微生物生態学的に比較検討したので, その結果について報告する。

\*1 北海道大学水産学部生物化学工学講座 (\*2 旧微生物学講座)

(\*1 Laboratory of Biochemical Process Technology, Faculty of Fisheries, Hokkaido University)

## 材料および方法

### 供試飼育水

日本栽培協会宮古事業場（以下宮古事業場と略す）のヒラメ種苗生産水槽を対象に、1989年5月から1990年7月の間に種苗生産過程に沿って生産開始直後（水槽 No. 1）、第1回分槽後（水槽 No. 1, 2）および第2回分槽後（水槽 No. 1, 2, 1-2, 2-2）の3回計6回、14検体（Table 1）を飼育水槽の排水管から滅菌三角フラスコあるいは滅菌スピッツ管を用いて採取し、直ちに実験に供した。

### 供試飼育用餌料

宮古事業場において、ヒラメ稚仔魚飼育のために培養中のシオミズツボワムシ (*Branchionus plicatilis*) およびアルテミア (*Artemia salina*) ならびに市販の配合飼料（協和発酵）を6回、計9検体を採取し実験に供した。ワムシとアルテミアは培養水槽に備え付けの網を用い培養液を濾過して採取し、ストマッカー用（オルガノ）ポリ袋に移した。配合飼料は直接ストマッカー用ポリ袋を用いて採取した。

### 供試魚

宮古事業場で飼育中のヒラメ稚仔魚を分槽毎に6回、計14検体を採取し実験に供した。実験開始時の魚齢は孵化後1日、第1分槽時が14日齢、第2分槽時は40日齢であった。なおこの間の飼育水温は17～18°Cであった。

### 生菌数の測定法

飼育水はそのまま原液から、飼育用餌料および供試魚の魚体表面（消化管の菌数を含む）は、試料を秤量後、10倍量の75% Herbst人工海水を加えてストマッカーを用いてホモジナイズし、10倍希釈法による希釈液列を作製した。さらに供試魚の一部については Muroga et al. (1987) の方法に従い、茶こしに供試魚を取り、0.1% 塩化ベンザルコニウム水溶液に1分間浸漬し、その後、水道水で30秒間洗浄した。洗浄後前述の魚体表面試料と同様ホモジナイズし、この試料の生菌数をもって消化管の菌数とした。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、出現コロニー数から常法により生菌数を算出した。なお生菌数は飼育水は1 ml 当り、他は湿重量1 g 当りとして算出した。

### 供試菌株の分離法

飼育水および飼育魚については2回の分槽時に、ワムシについては開始時に、アルテミアは第1回分槽時の試料を対象に、それぞれ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個釣菌し、純粋分離を行なって供試菌株を得た。

### 分離菌株の分類

分離菌株は絵面・清水の方法 (1992) により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なった。

## 結 果

## 生菌数

宮古事業場の飼育水の生菌数を採水日、採水槽と共に Table 1 に示した。1989 年飼育開始時に飼育水の生菌数は  $2.2 \times 10^5$  CFU/ml を示した。第 1 回分槽時に  $3.6 \times 10^5$  と  $1.0 \times 10^6$  CFU/ml、第 2 回分槽時には  $5.3 \times 10^4 \sim 3.2 \times 10^5$  CFU/ml の範囲で測定され、第 1 回分槽時に若干高い値を示した。一方、1990 年でも飼育水の生菌数は第 1 回分槽時に  $10^7$  CFU/ml と、開始時、第 2 回分槽時の  $10^5$  から  $10^6$  CFU/ml に比較して高い値を示した。

餌料の生菌数を Table 2 に示した。生物餌料であるワムシとアルテミアは共に高い生菌数を示し、ワムシで  $4.1 \sim 7.0 \times 10^8$  CFU/g、アルテミアは  $1.0 \times 10^7 \sim 1.2 \times 10^8$  CFU/g と測定された。一方、市販の配合飼料は  $2.3 \times 10^4 \sim 1.2 \times 10^5$  CFU/g と測定され、前 2 者に比較して少なかった。

ヒラメ稚仔魚の魚全体および消化管の生菌数を採取飼育槽と共に Table 3 および 4 に示した。魚体の生菌数は 1989 年では調査した 3 回を通じ  $2.9 \times 10^6 \sim 1.7 \times 10^8$  CFU/g の範囲で測定され、開始時に若干高い値を示したが大きな差は認められなかった。1990 年では第 2 分槽時に  $6.7 \times 10^5 \sim 4.9 \times 10^6$  CFU/g となり、前 2 回の  $10^7$  CFU/g に比べ減少した。消化管の生菌数は 1989 年で  $7.0 \times 10^4$  から  $1.0 \times 10^8$  CFU/g の範囲で測定され、魚体の生菌数と比べ全体的には若干少ない値を示した。1990 年では第 2 回分槽時に  $1.5 \times 10^5 \sim 3.9 \times 10^6$  CFU/g となり、第 1 回分槽時の  $10^7$  CFU/g に比較して減少した。

Table 1. Viable bacterial counts (CFU/ml) in rearing water

Tank No.	Sampling date					
	1989			1990		
	25, May	9, June	5, July	25, May	12, June	3, July
1	$2.2 \times 10^5$	$1.0 \times 10^6$	$3.2 \times 10^5$	$1.6 \times 10^6$	$1.8 \times 10^7$	$1.1 \times 10^6$
2	NT*	$3.6 \times 10^5$	$4.7 \times 10^4$	NT	$1.6 \times 10^7$	$1.2 \times 10^6$
1-2	NT	NT	$1.4 \times 10^5$	NT	NT	$7.8 \times 10^5$
2-2	NT	NT	$5.3 \times 10^4$	NT	NT	$5.3 \times 10^5$

NT\* : Not tested

Table 2. Viable bacterial counts (CFU/g) in diets for flounder

Sample	Sampling date					
	1989			1990		
	25, May	9, June	5, July	25, May	12, June	3, July
Rotifer	$5.5 \times 10^8$	$4.1 \times 10^8$	NT	$5.1 \times 10^8$	$7.0 \times 10^8$	NT
Artemia	NT*	$1.9 \times 10^7$	$1.0 \times 10^7$	NT	$1.2 \times 10^8$	NT
Pellet food	NT	NT	$1.2 \times 10^5$	NT	NT	$2.3 \times 10^4$

NT\* : Not tested

Table 3. Viable bacterial counts (CFU/g) of larvae and juveniles of flounder

Tank No.	Sampling date					
	1989			1990		
	25, May	9, June	5, July	25, May	12, June	3, July
1	$1.7 \times 10^8$	$2.4 \times 10^7$	$4.1 \times 10^7$	$7.7 \times 10^7$	$2.5 \times 10^7$	$2.0 \times 10^6$
2	NT*	$7.7 \times 10^7$	$2.9 \times 10^6$	NT	$4.6 \times 10^7$	$1.5 \times 10^6$
1-2	NT	NT	$1.2 \times 10^7$	NT	NT	$4.9 \times 10^6$
2-2	NT	NT	$4.3 \times 10^6$	NT	NT	$6.7 \times 10^5$

NT\*: Not tested

Table 4. Viable bacterial counts (CFU/g) in intestinal tract of flounder

Tank No.	Sampling date					
	1989			1990		
	25, May	9, June	5, July	25, May	12, June	3, July
1	$2.3 \times 10^7$	$1.0 \times 10^8$	$5.2 \times 10^5$	NT	$3.1 \times 10^7$	$3.6 \times 10^5$
2	NT*	$6.1 \times 10^6$	$1.2 \times 10^6$	NT	$1.9 \times 10^7$	$1.5 \times 10^5$
1-2	NT	NT	$9.0 \times 10^4$	NT	NT	$1.6 \times 10^6$
2-2	NT	NT	$7.0 \times 10^4$	NT	NT	$3.9 \times 10^6$

NT\*: Not tested

### 細菌叢

飼育水、餌料、稚仔魚の魚体および消化管から分離した 683 株より継代不能株を除いた 623 株について、絵面・清水の方法に準拠して属レベルの分類を行なった。結果は各属の出現率として Table 5~8 に示した。

飼育水では、1989 年の開始時 *Flavobacterium* が 51.7% と菌叢の主体をなし、*Acinetobacter* (20.7%), *Moraxella* (10.3%), *Vibrio* (6.9%) および *Pseudomonas* (6.9%) などによって構成されていたが、分槽が進むにつれ *Moraxella* の占める割合が増加し、第 2 回分槽時には 46.4% を占めるに至った (Table 5)。一方、1990 年では開始時 *Acinetobacter* (48.4%) と *Moraxella* (34.5%) が優勢であったが、分槽が進むにつれ *Moraxella* の占める割合が大きくなった。

餌料では、種類により細菌叢に違いが観察され、ワムシでは 1989 年に *Flavobacterium* (36.7%) と *Moraxella* (23.3%), *Alteromonas* (26.7%) が、1990 年では *Moraxella* (57.2%) と *Vibrio* (28.6%) が主体をなしていた。アルテミアでは 両年共に *Vibrio* (83.4~96.7%) が主体を成していた。いずれの年も市販の配合飼料はグラム陽性菌が優勢であった (Table 6)。

稚仔魚の魚体の細菌叢は、1989 年飼育開始時と第 1 回分槽時には *Flavobacterium* (30 および 24.1%) と *Moraxella* (30 および 31%), *Vibrio* (40 および 37.9%) がほぼ同程度に観察されたが、第 2 回分槽時には *Vibrio* が 100% を占めるようになった (Table 7)。1990 年でも分槽毎に *Vibrio* (開始時 63.0%, 第 1 回分槽時 66.7%, 第 2 回分槽時 93.4%) の占める割合が高くなった。

稚仔魚の消化管の細菌叢は、1989 年開始時には *Flavobacterium* (80%) が優勢であったが、第 1

吉水ら：ヒラメ稚仔魚の細菌叢

Table 5. Generic composition (%) of bacteria isolated from rearing water

Genus	Sample date					
	1989			1990		
	25, May	9, June	5, July	25, May	12, June	3, July
Number of the isolates	10	28	20	29	29	11
<i>Flavobacterium</i>	51.7	15.0	14.3	NT*	0.0	30.0
<i>Acinetobacter</i>	20.7	15.0	3.6	48.4	9.1	10.0
<i>Moraxella</i>	10.3	40.0	46.4	34.5	72.7	50.0
<i>Cytophaga</i>	3.5	0.0	3.6	NT	NT	NT
<i>Vibrio</i>	6.9	5.0	3.6	3.4	0.0	10.0
<i>Pseudomonas</i>	6.9	15.0	10.7	3.4	0.0	0.0
<i>Alteromonas</i>	0.0	0.0	10.7	3.4	0.0	0.0
<i>Alcaligenes</i>	0.0	5.0	7.1	NT	NT	NT
Not identified	0.0	5.0	0.0	0.0	18.2	0.0

NT\* : Not tested

Table 6. Generic composition (%) of bacteria isolated from rotifer, *Altemia* and artificial pellets for flounder

Genus	Sample date					
	1989			1990		
	Rotifer	Altemia	Pellets	Rotifer	Altemia	Pellets
Number of the isolates	30	30	23	28	30	30
<i>Flavobacterium</i>	36.7	0.0	0.0	0.0	3.3	0.0
<i>Acinetobacter</i>	3.3	0.0	0.0	0.0	0.0	3.3
<i>Moraxella</i>	23.3	3.3	0.0	57.2	0.0	0.0
<i>Vibrio</i>	10.0	96.7	0.0	28.6	83.4	0.0
<i>Alteromonas</i>	26.7	0.0	0.0	0.0	13.3	0.0
<i>Bacillus</i>	0.0	0.0	26.1	0.0	0.0	86.7
<i>Coryneforms</i>	0.0	0.0	73.9	7.1	0.0	10.0
Not identified	0.0	0.0	0.0	7.1	0.0	0.0

回分槽時には餌料の細菌叢と同様 *Vibrio* (70%) が優勢となり、第2回分槽時にも *Vibrio* (96.7%) が菌叢の主体を成していた。また1990年では、第1回分槽時から *Vibrio* (93.4%) が主体を成し、第2回分槽時には第1回分槽時に比較して若干減少がみられたが、体表の細菌叢と同様に *Vibrio* が優勢であった (Table 8)。

Table 7. Generic composition (%) of bacteria isolated from larvae and juveniles of flounder

Genus	Sample date					
	1989			1990		
	25, May	9, June	5, July	25, May	12, June	3, July
Number of the isolates	30	30	30	27	30	30
<i>Flavobacterium</i>	30.0	24.1	0.0	7.4	0.0	3.3
<i>Moraxella</i>	30.0	31.0	0.0	22.2	0.0	3.3
<i>Vibrio</i>	40.0	37.9	100.0	63.0	66.7	93.4
<i>Pseudomonas</i>	0.0	3.5	0.0	0.0	3.3	0.0
<i>Alteromonas</i>	0.0	3.5	0.0	0.0	20.0	0.0
<i>Coryneforms</i>	NT*	NT	NT	7.4	3.3	0.0
Not identified	0.0	0.0	0.0	0.0	6.7	0.0

NT\* : Not tested

Table 8. Generic composition (%) of bacteria isolated from intestinal tract of flounder

Genus	Sample date				
	1989			1990	
	25, May	9, June	5, July	12, June	3, July
Number of the isolates	30	30	30	30	29
<i>Flavobacterium</i>	80.0	0.0	3.3	0.0	3.4
<i>Moraxella</i>	0.0	30.0	0.0	0.0	0.0
<i>Vibrio</i>	16.7	70.0	96.7	93.4	69.2
<i>Cytophaga</i>	3.3	0.0	0.0	0.0	0.0
<i>Pseudomonas</i>	0.0	0.0	0.0	0.0	10.3
<i>Alteromonas</i>	0.0	0.0	0.0	3.3	3.3
<i>Coryneforms</i>	0.0	0.0	0.0	0.0	3.4
<i>Alcaligenes</i>	0.0	0.0	0.0	0.0	6.9
Not identified	0.0	0.0	0.0	3.3	3.3

### 考 察

ヒラメ飼育水槽の生菌数は  $10^5$  から  $10^7$  CFU/ml の範囲で測定され、特に第1回分槽時に高い値が得られた。ヒラメ飼育用飼料の生菌数はワムシで  $10^8$  CFU/g, アルテミアで  $10^7$  CFU/g, 配合飼料では  $10^5$  CFU/g であった。一方、ヒラメの生菌数は両年共に分槽が進むにつれ漸減する傾向がみられた。消化管の生菌数についても魚体の生菌数同様漸減する傾向が見られた。一般に魚類の消化管内には  $10^4 \sim 10^9$  CFU/g と多数の細菌が存在することが知られているが、本実験の供試魚においても同様の結果であった。

これらの細菌叢は飼育水槽の場合、1989年では当初 *Flavobacterium* あるいは *Acinetobacter* が

主体をなし、*Moraxella*、*Flavobacterium* がこれについて多かった。両年共に分槽が進むにつれ *Moraxella* の占める割合が増加していった。飼育用餌料ではワムシで *Moraxella* および *Vibrio* がその主体を成し、アルテミアでは *Vibrio* が主体を成していた。しかし配合飼料では *Coryneforms* と *Bacillus* がその主体を成し、生物餌料と全く異なった菌叢を示した。これに対しヒラメの体表では分槽毎に *Vibrio* の占める割合が高くなった。消化管でも *Vibrio* が主体をなしていた。なお今回の調査期間中、疾病の発生は観察されなかった。

以上のヒラメ飼育水および飼育魚の体表、消化管の生菌数は、同地域で飼育されているサケ科魚類の生菌数とほぼ同数であり、その菌叢も類似したものであった(絵面ら, 1980)。また宮古は日裁協の事業所の中では厚岸事業所に次ぎ北方に位置しているが、飼育用餌料生物のワムシおよびヒラメの体表、消化管の生菌数、菌叢は瀬戸内海で飼育されたヒラメと類似の傾向が認められた(宮川・室賀, 1988; Tanasomwang and Muroga, 1988, 1989)。魚類の腸内細菌叢については、魚の腐敗や人畜由来の腸内細菌による汚染など、主として食品衛生的観点から、また魚類の生理、疾病に関連して古くから研究が行われている。魚類の消化管内には多数の細菌が存在することが知られているが、その細菌叢は体表、鰓などの細菌叢と異なり、特定の優勢種が認められているという報告が多い(Muroga et al., 1987, 1989; 絵面ら, 1980; 吉水ら, 1976a-e)。ヒラメ稚魚の消化管は全長 5 mm 以上、孵化後 14~21 日後に機能するようになると報告され(南, 1982)、供試稚仔魚は第 2 回分槽時にこの時期を迎えていたものと推察される。開始時の消化管内細菌槽は飼育水の菌叢の影響がみられたのに対し第 1, 第 2 回分槽時では海産魚の消化管内細菌叢及び餌料であるアルテミアの細菌叢の主体をなす *Vibrio* が優勢となっていた。これはサケマス類同様、まず孵化後、体表、鰓、口腔に飼育水中の細菌群が付着増殖し、さらに消化管の発達によりこれらの細菌が消化管内に運ばれ、消化管の環境に適応した菌種がそこに定着したと考えられる(吉水ら, 1980)。

1989 年の実験期間中、宮古事業場でヒラメ稚仔魚の疾病が発生しなかったこと、また、1990 年の実験結果が 1989 年のものとほぼ同様の結果を示したことから、これらの結果が一般的なヒラメ種苗生産水槽の細菌叢を示していると考えられる。したがって今後、大量死等の事故が発生し、細菌感染症が疑われる病魚の細菌検査を実施する場合、その対照として今回のデータは重要な意義をもつと考える。さらに疾病対策上からは、疾病発生時や過密飼育等の不適な環境における種苗の生菌数およびその時の菌叢についても検討し、環境要因の菌叢に及ぼす影響についても検討しておく必要があると考える。

## 謝 辞

本研究の遂行にあたり、試料の提供並びに種々のご配慮・ご便宜を頂いた日本栽培漁業協会宮古事業場の福永辰廣、津崎龍雄の両氏に深甚なる感謝を申し上げる。

## 文 献

- 絵面良男・清水 潮 (1992) 水質・微生物編, pp. 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.
- 絵面良男・山本啓之・吉水 守・田島研一・木村喬久 (1980) 大槌臨海研究センター報告, 6, 51-62.
- 南 卓志 (1982) ヒラメの初期生活史, 日本誌, 48, 1581-1588.
- 宮川宗記・室賀清邦 (1988) シオミズツボワムシ *Brachionus plicatilis* の細菌叢, 水産増殖, 35, 237-243.
- Muroga, K., M. Higashi and H. Keitoku (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.
- 西岡豊弘・古澤 徹・水田洋之介 (1997) 種苗生産過程の海産魚介類における疾病発生状況, 水産増殖, **45**, 285-290.
- Tanasomwang, W. and K. Muroga (1988) Intestinal microflora of larval and juvenile stages in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Fish Pathology*, **23**, 77-83.
- Tanasomwang, W. and K. Muroga (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., Y. Ezura and T. Kimura (1982) Effect of antibacterial action of sea water on the viability of some bacterial species. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.*, **48**, 1427-1431.
- 吉水 守・木村喬久・坂井 稔 (1976a) サケ科魚類の腸内細菌叢に関する研究-I. 飼育魚の腸内細菌叢, 日水誌, **42**, 91-99.
- 吉水 守・木村喬久・坂井 稔 (1976b) サケ科魚類の腸内細菌叢に関する研究-II. 人為的海水移行および餌止め飼育の腸内細菌叢におよぼす影響, 日水誌, **42**, 863-873.
- 吉水 守・木村喬久・坂井 稔 (1976c) サケ科魚類の腸内細菌叢に関する研究-III. 海洋棲息魚の腸内細菌叢, 日水誌, **42**, 875-884.
- 吉水 守・神山和義・木村喬久・坂井 稔 (1976d) サケ科魚類の腸内細菌叢に関する研究-IV. 河川および湖沼棲息魚の腸内細菌叢, 日水誌, **42**, 1281-129.
- 吉水 守・木村喬久・坂井 稔 (1976e) サケ科魚類の腸内細菌叢に関する研究-V. 遡河魚の腸内細菌叢, 日水誌, **42**, 1291-1298.
- 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.