

## 止水方式におけるヒラメ初期飼育水の細菌相

|       |                                                                                                                                 |
|-------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| メタデータ | 言語: Japanese<br>出版者:<br>公開日: 2025-04-24<br>キーワード (Ja):<br>キーワード (En):<br>作成者: 阪本, 憲司, 高橋, 庸一, 岡, 雅一, 板垣, 恵美子<br>メールアドレス:<br>所属: |
| URL   | <a href="https://fra.repo.nii.ac.jp/records/2014489">https://fra.repo.nii.ac.jp/records/2014489</a>                             |

This work is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License.



# 止水方式におけるヒラメ初期飼育水の細菌相<sup>\*1</sup>

阪本 憲 司<sup>\*2</sup>・高橋 庸 一<sup>\*2</sup>・岡 雅 一<sup>\*3</sup>・板垣恵美子<sup>\*3</sup>

## Bacterial Flora in Still Water Larviculture of the Japanese Flounder *Paralichthys olivaceus*

Kenji SAKAMOTO, Yoh-ichi TAKAHASHI,  
Masakazu OKA, and Emiko ITAGAKI

1998年6月1日受理

ヒラメの種苗生産の方法の一つとして、浮遊期間には極力止水状態を維持し、飼育水槽内でワムシの増殖とヒラメ仔魚の飼育を同時に行う、いわゆる「ほっとけ飼育」が行われている<sup>1-3)</sup>。「ほっとけ飼育」では、ナンノクロロプシス添加の効果をワムシ餌料としての側面のみから捕らえ、飼育水に高濃度のナンノクロロプシスを添加、維持する方法が行われている<sup>1,2)</sup>。また、水槽内でワムシの増殖を行うため、出来るだけ止水で飼育することが好ましく、通常、止水期間は水作りから2週間以上と長い<sup>1,2)</sup>。

これまで量産規模で、1986～1993年の8年間に11例の「ほっとけ飼育」が実施されたが<sup>4-11)</sup>、いずれの飼育例でも疾病の出現は認められていない。これは、止水状態で飼育を行うことにより飼育水中の細菌相が変化し、これが病原菌の出現を防除する結果をもたらしたためではないかと推察されている。

微生物の拮抗（寄生、捕食、抗生および競争）作用を利用した病害防除の方法は、生物学的防除いわゆるバイオコントロールと称され、ガザミの種苗生産で効果が実証されている<sup>12,13)</sup>。ヒラメの種苗生産においても、技術開発の一方向として積極的に導入すべき技術である。

本報告では、バイオコントロール法応用への基礎試験として、浮遊期間を「ほっとけ飼育」に準じた止水方式と標準的な流水方式で飼育し、飼育水中における細菌相

の差と変化について比較検討した。

### 材料と方法

**試験区の設定** 試験は、1997年3月31日から日本栽培漁業協会伯方島事業場において、50 m<sup>3</sup>水槽を用いた種苗生産の過程で行った。試験期間はふ化から21日目までとした。試験区として、この期間を止水状態で飼育する止水区と、初期から換水を行う流水区の2試験区を設けた（表1）。

**飼育方法** 止水区の飼育方法は、既報の飼育方法に準じて行った<sup>1,2)</sup>。まず、ナンノクロロプシスを1,440万細胞/mlの密度で培養水ごと添加して水作りし、これに受精卵180万粒を収容した。ふ化（150万尾）と同時にL型ワムシ *Brachionus plicatilis* を11個体/mlの密度で添加し、自然増殖を期待した。L型ワムシは7日目に18個体/mlまでしか増殖しなかったため、8日目以降はS型ワムシ *B. rotundiformis* を与えた。飼育水中のナンノクロロプシス密度が低下した場合は、4～6 lの淡水クロレラ（生クロレラ V-12: クロレラ工業）を添加した。飼育環境の指標として全アンモニア態窒素（以下、TA-N）の値を測定し<sup>2)</sup>、TA-N値が7 ppm以上に急増したふ化後8日目前後に14%/日の換水を行ったが、流水による飼育は15日目から行った（図1）。流水区の飼育は、まず、水

<sup>\*1</sup> 本論文の概要は、平成9年度日本水産学会秋季大会において発表した。

<sup>\*2</sup> 福山大学附属内海生物資源研究所 〒722-2101 広島県因島市大浜町 452-10 (Research Institute of Marine Bioresources, Fukuyama University, Ohama, Innoshima, Hiroshima 722-2101 Japan).

<sup>\*3</sup> 日本栽培漁業協会伯方島事業場 〒794-2305 愛媛県越智郡伯方町木浦。

表 1. 種苗生産の概要

|               | 止水飼育（止水区）                                | 流水飼育（流水区）              |
|---------------|------------------------------------------|------------------------|
| 飼育開始          | 1997 年 3 月 31 日                          |                        |
| 飼育水槽          | 50 m <sup>3</sup>                        | 50 m <sup>3</sup>      |
| ナンノクロロプシス密度   | 1,440 万細胞/ml（卵収容時）                       | 100 万細胞/ml             |
| ふ化仔魚数         | 180 万粒（卵収容）ふ化仔魚で 150 万尾                  | 66 万尾（ふ化仔魚収容）          |
| ワムシ投餌         | L 型ワムシを 11 個体/ml で接種<br>8 日目以降 S 型ワムシを添加 | S 型ワムシを 5 個体/ml で維持    |
| 止水期間          | ふ化後 14 日目まで                              | 飼育開始から微量の換水            |
| 底掃除           | 行わず                                      | 1 日 1 回底掃除器で実施         |
| 平均水温          | 18.0°C (16.2~18.5°C)                     | 17.8°C (15.0~19.0°C)   |
| pH            | 7.4 (7.2~7.8)                            | 7.9 (7.8~8.1)          |
| DO            | 5.61 ppm (4.8~6.2 ppm)                   | 6.08 ppm (4.4~7.2 ppm) |
| 全アンモニア態窒素     | 12 ppm まで上昇（8 日目）                        | 測定せず                   |
| 成長（ふ化後 20 日目） | 全長 9.7 mm                                | 全長 9.9 mm              |
| 生残率（同）        | 60.0%                                    | 60.6%                  |

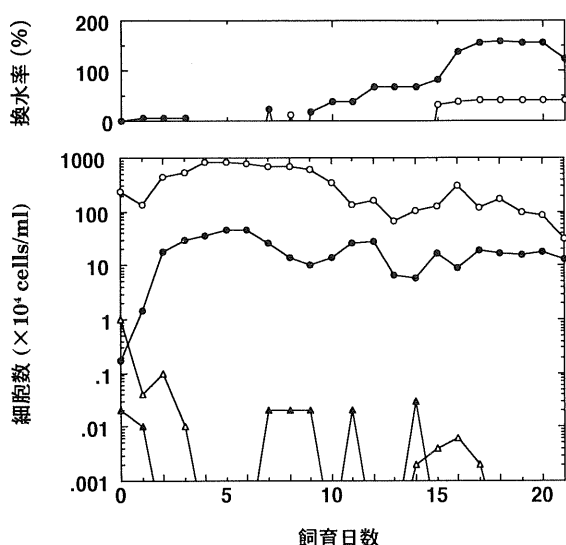


図 1. 止水飼育および流水飼育の換水率と、ZoBell 培地および TCBS 培地に出現した各試験区の細菌数  
換水率—○: 止水区, ●: 流水区.  
ZoBell 培地—○: 止水区, ●: 流水区.  
TCBS 培地—△: 止水区, ▲: 流水区.

作りとともにふ化仔魚 66 万尾を収容して飼育を開始し、ナンノクロロプシス密度は 50~100 万細胞/ml を維持するように毎日添加した。餌料には S 型ワムシを用い、5 個体/ml の密度を維持するように適宜添加した。換水は飼育開始から 5~7%/日の割合で行い、仔魚の成長に合わせ次第に増加させた。

なお、L 型ワムシおよび S 型ワムシとも、投餌直前に水産用エルバージュ 10% 顆粒（上野製薬）2 ppm により 2 時間以内の薬浴を行った。また、換水には紫外線流水殺菌装置（フロライザー 4LD: 千代田工販）で殺菌した濾過海水を用いた。

止水区と流水区では、飼育方法が異なるためヒラメふ化仔魚の収容尾数に大きな差があるが、試験終了時の成長と生残（ふ化後 20 日目）はほぼ同様であった（表 1）。  
**細菌の分離と性状試験** 試験期間中、毎朝 9 時に両区か

ら飼育水を採取した。これを原液として、10 倍ずつ  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ , および  $10^{-3}$  まで希釈した。各段階の希釈液から 100  $\mu$ l を採り、ZoBell's 2216e 寒天培地（DIFCO, 以下 ZoBell 培地）および TCBS 寒天培地（田辺製薬, 以下 TCBS 培地）に拡げ、15~16°C で 7 日間の培養を行った。単離された細菌のうち出現頻度の高い株については、グラム染色（DIFCO）とグラム陰性桿菌同定キット（api 20NE: BIO MERIEUX S.A.）により性状試験（1 検体につき 5 回）を行った。

**感染試験** 福山大学附属内海生物資源研究所で飼育中の全長 5.5 mm のヒラメ仔魚を用い、浸漬法による感染試験を行った。試験には 500 ml プラスチック容器を用い、滅菌海水 250 ml を入れエアーストーンにより微通気を行った。仔魚の収容尾数はそれぞれ 20 尾とした。この中に、ZoBell 培地と TCBS 培地で培養した各供試菌株を  $10^7$  細胞/ml となるように添加した。飼育容器は、20°C に設定した恒温器に収容し、24 時間後の仔魚の生残状態を観察した。

## 結 果

**飼育水の細菌数** ふ化後 21 日目までの、止水区および流水区に出現した細菌数を図 1 に示した。

ZoBell 培地に出現した止水区の総細菌数は、試験開始日から  $2 \times 10^6$  CFU/ml と高い値を示し、終了時まで  $10^6$  CFU/ml 台（最大で  $8 \times 10^6$  CFU/ml まで増殖）を維持した。一方、流水区の試験開始日の総細菌数は  $2 \times 10^3$  CFU/ml であったが、ふ化後 2 日目にワムシの投餌を行ったところ  $2 \times 10^5$  CFU/ml まで急増した。その後は  $10^5$  CFU/ml 台（最大で  $5 \times 10^5$  CFU/ml まで増殖）で推移し、止水区と比較して 1 桁低かった。

TCBS 培地では、試験開始日の総細菌数は、止水区で  $10^4$  CFU/ml、流水区で  $2 \times 10^2$  CFU/ml であったが、これらは試験開始から数日以内に急激に減少した。換水に伴い、再び細菌の出現が認められたが、細菌数は止水

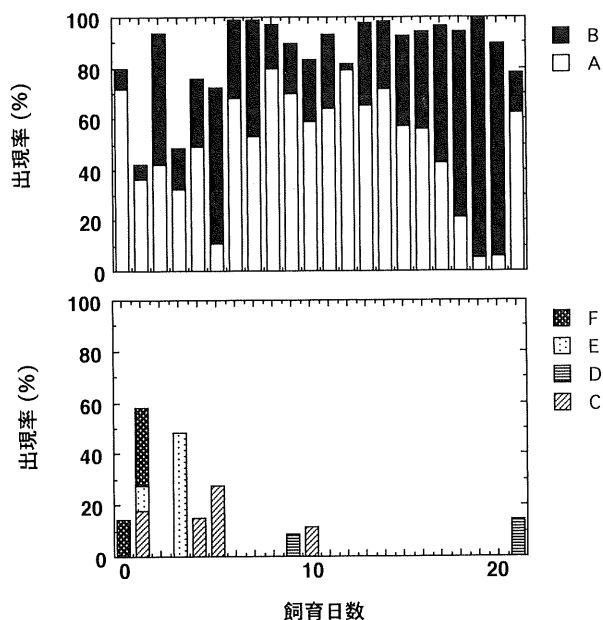


図2. ZoBell 培地に出現した止水飼育（止水区）の細菌種と出現率

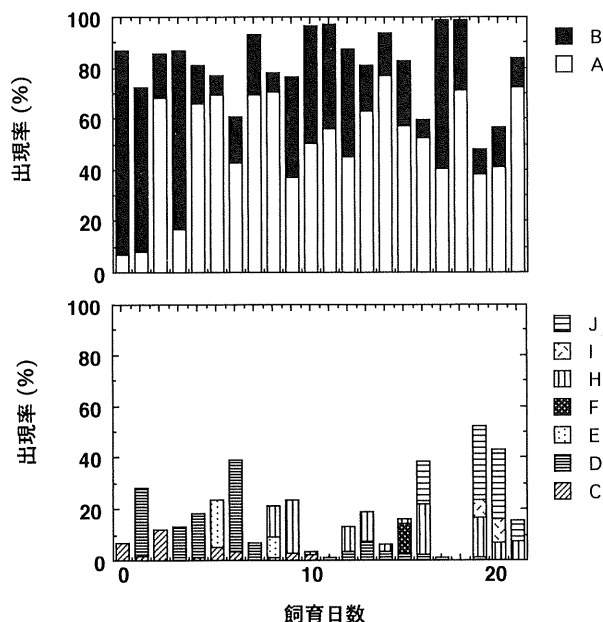


図3. ZoBell 培地に出現した流水飼育（流水区）の細菌種と出現率

区で1~60 CFU/ml, 流水区で1~300 CFU/mlであった。

**細菌の同定と出現状況** 出現した細菌をコロニーの色と形状により区分すると、ZoBell 培地では止水区で12株（A~L）、対照区で16株（A~P）の菌株が認められた。共通した菌株のうちとくに出現率（10%以上）が高いのはA~F株の6株で、それぞれのコロニーの色は、A:透明白、B:白、C:黄、D:透明黄、E:赤、およびF:透明赤であった。これら6株について性状試験を行ったところ、A株は *Aeromonas* 属、B株は *Pseudomonas* 属、C株

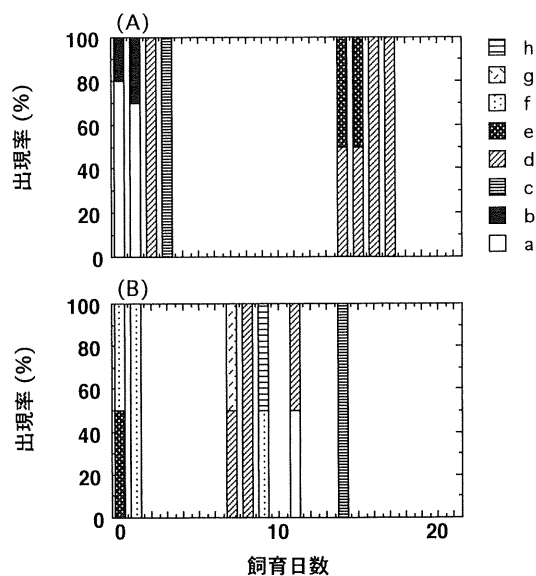


図4. TCBS 培地に出現した止水飼育（止水区，A）および流水飼育（流水区，B）の細菌種と出現率

は *Flavimonas* 属、D株は *Flavobacterium* 属に同定されたが、EおよびF株は同定できなかった。

各菌株の出現状況を経日的に見ると、止水区では、飼育初期にはA株が安定した出現を示したが、換水に伴いB株が増加する傾向が認められた（図2）。C~F株のうち、C、EおよびF株が5日目までの飼育初期に多く出現した。また、D株は9日目と21日目のみ認められた。なお、G~L株の出現率は1%以下であった。

流水区では、飼育開始日にはB株が優占したが、2日目以降はA株の出現率が高くなった（図3）。C~J株では、D、HおよびJ株の出現率が高く、D株は試験期間を通して、H株は8日目以降に、またJ株は16日目以降に出現した。なお、GおよびK~P株の出現率は1%以下であった。

TCBS 培地に出現した細菌は、止水区が5株（a~e）、流水区が7株（a, c~h）であったが、菌相は単純で1日の出現菌株数はすべて2株以内であった（図4）。両区に共通して出現したのは4株（a, c~e）で、それぞれのコロニーの色は、a:透明緑、c:緑、d:黄、およびe:透明黄であった。これら4株の菌株について性状試験を行ったところ、すべて *Vibrio* 属に同定された。

**感染試験** ZoBell 培地に出現したA~Fの菌株を用いて行った感染試験の結果を表2に示した。6株のうち、24時間の浸漬でヒラメ仔魚への感染が認められたのはD株の *Flavobacterium* sp. のみであった。また、TCBS 培地に出現したa, c~e株の仔魚への感染は、24時間の浸漬では認められなかった。

## 考 察

本試験では、ヒラメ浮遊期間における止水飼育（止水区）および流水飼育（流水区）の細菌相の差と経日変化に

表 2. 止水飼育（止水区）および流水飼育（流水区）において ZoBell 培地での出現率が比較的高かった各細菌のヒラメ仔魚（全長 5.5 mm）への感染（24 時間浸漬）

|                                                                                                                                | 細菌   |      |      |       |      |      |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|------|------|-------|------|------|
|                                                                                                                                | A    | B    | C    | D     | E    | F    |
| 感 染<br>(斃死数/尾数)                                                                                                                | 0/20 | 0/20 | 0/20 | 17/20 | 0/20 | 0/20 |
| A: <i>Aeromonas</i> sp., B: <i>Pseudomonas</i> sp., C: <i>Flavimonas</i> sp.,<br>D: <i>Flavobacterium</i> sp., E: 未同定, F: 未同定. |      |      |      |       |      |      |

ついて比較を行った。総細菌数は、止水区で  $10^6$  CFU/ml 台、対照区で  $10^3 \sim 10^5$  CFU/ml となり、ワムシの添加量の多い止水区で比較的高い値を示した。これまでの報告では、ワムシに含まれる細菌数は、ZoBell 培地および BTB 培地でそれぞれ  $10^8 \sim 10^9$ ,  $10^7 \sim 10^9$  CFU/g<sup>14)</sup>, TS 培地で  $10^7 \sim 10^8$  cells/g<sup>15)</sup>, これら 3 種の培地で  $10^8 \sim 10^{10}$  cells/g<sup>16)</sup> であった。また、ワムシ培養液中の細菌数は、ZoBell 培地で  $10^5 \sim 10^6$ , BTB 培地で  $10^3 \sim 10^4$  CFU/ml であり<sup>17)</sup>, 通常  $10^8$  CFU/ml に至ることが知られている<sup>18)</sup>。これらの結果は、人為的に大量培養されたワムシが常に高い細菌数を有していることを示唆しており、両区において飼育初期の細菌数が高い値を示したのは、主にワムシ由来の細菌によるものであると考えられた。

本試験において、*Vibrio* 属菌の選択培地である TCBS 培地に出現した *Vibrio* 属菌は、止水区で 5 株、流水区で 7 株であり、ワムシ投餌回数が多い流水区で多くなった。また、*Vibrio* 属菌数は、両区において飼育開始日に多く見られたが、数日以内に急激に減少した。各種魚類の細菌性疾患に関する報告<sup>14, 16, 19-25)</sup> では、原因菌としての *Vibrio* 属菌は、主にワムシなどの餌料生物に由来すると考えられている。従って、ワムシ投餌回数の増加により、病原性の *Vibrio* 属菌が混入する可能性が高くなることが考えられる。このことから、ワムシ投餌回数が少ない止水飼育は、*Vibrio* 属菌の混入防除においてより有効的であると考えられた。

ヒラメ仔魚への感染が認められた *Flavobacterium* sp. (D 株) の出現は、止水区で 9 日目と 21 日目に認められ、流水区ではほぼ期間を通じて認められた。また、D 株の出現率は、止水区で低く（最大で 15.0%）、流水区で高く（最大で 35.6%）になった。これを細菌数で比較すると、出現数が最も多くなったのは止水区の  $1.2 \times 10^5$  CFU/ml (9 日目)、流水区の  $5 \times 10^4$  CFU/ml (6 日目) であった。しかし、今回の試験では試験期間中の飼育は順調であり疾病の出現は認められなかった。*Flavobacterium* は、元来ナンノクロブシス培養水の優占菌であることが知られている<sup>18)</sup>。また、ワムシをナンノクロブシス培養水に入れると、ワムシの排泄により水の栄養状態が変化し、*Flavobacterium* から *Pseudomonas* に遷移することが知られている<sup>18)</sup>。このことから、止水区において *Flavobacterium* sp. (D 株) の出現率が低かったのは、高密度の

ワムシ添加による水の栄養状態の変化によるものであると推察された。

1993~1996 年にかけて、伯方島事業場では細菌性腸管白濁症 (*Vibrio* INFL) が出現し甚大な被害を与えた<sup>26-29)</sup>。今回の飼育では、これまでと同じ飼育方法であった流水区でも細菌性疾病の出現が認められなかった。止水区および流水区とも試験期間を通じて *Aeromonas* sp. (A 株) と *Pseudomonas* sp. (B 株) の出現が優占した。両者を併せた平均出現率は止水区で 86.6% (42.1~100%)、流水区で 80.8% (47.8~98.9%) であり、これら A, B 両株の優占が病原性細菌の増殖を阻害した可能性が考えられる。とくに、止水区では流水区に比べて、試験期間に出現した菌株数が ZoBell および TCBS 培地ともに少なく、さらに A, B 両株の細菌数が 10 倍以上高くなることで病原菌などの他の菌が増殖する余地を減じている可能性が示唆された。このことから、優占菌の菌数が多く、出現する菌株数が制限される止水飼育は、細菌相の安定性の面で優れていると考えられる。両区で単離された各菌株がバイオコントロールとして利用可能かについては、A, B 株を中心にさらに検討を行う必要がある。また、本研究の種苗生産方法では、ワムシの増殖促進と細菌相からみた飼育環境の向上が重要な課題であり、バイオコントロール法への期待は大きい。

## 謝 辞

本研究を行うにあたり、細菌相調査の技術指導を行って頂いた日本栽培漁業協会小浜事業場の野上欣也主任技術員（現場長）に厚くお礼を申し上げる。また、研修期間中に多大なご協力を頂いた小浜事業場の伏見 浩場長（現福山大学工学部海洋生物工学科教授）ならびに技術員の皆様に感謝の意を表します。さらに、共同研究の機会を与えて頂いた日本栽培漁業協会伯方島事業場の福永辰廣場長ならびに技術員の皆様に厚くお礼を申し上げます。

## 文 献

- 1) 高橋庸一 (1990) ヒラメ種苗生産における生物餌料の軽減と飼育作業の簡素化. 水産増殖, **38**, 23-33.
- 2) 高橋庸一 (1998) ヒラメ種苗生産マニュアル—「ほっとけ飼育」による飼育方法. 栽培漁業技術シリーズ, **4**, 57 pp.
- 3) 友田 努 (1997) 種苗生産技術の開発, ヒラメ. 日栽協事業年報平成 7 年度, 144-145.
- 4) 日本栽培漁業協会 (1988) 種苗生産技術の開発, ヒラメ. 日栽協事業年報昭和 61 年度, 170-177.
- 5) 日本栽培漁業協会 (1989) 種苗生産技術の開発, ヒラメ. 日栽協事業年報昭和 62 年度, 139-156.
- 6) 日本栽培漁業協会 (1990) 種苗生産技術の開発, ヒラメ. 日栽協事業年報昭和 63 年度, 156-163.
- 7) 日本栽培漁業協会 (1991) 種苗生産技術の開発, ヒラメ.

- 日裁協事業年報平成元年度, 133-147.
- 8) 日本栽培漁業協会 (1992) 種苗生産技術の開発, ヒラメ. 日裁協事業年報平成2年度, 167-172.
  - 9) 日本栽培漁業協会 (1993) 種苗生産技術の開発, ヒラメ. 日裁協事業年報平成3年度, 136-147.
  - 10) 日本栽培漁業協会 (1994) 種苗生産技術の開発, ヒラメ. 日裁協事業年報平成4年度, 131-141.
  - 11) 日本栽培漁業協会 (1995) 種苗生産技術の開発, ヒラメ. 日裁協事業年報平成5年度, 137-141.
  - 12) 野上欣也・前田昌調 (1991) 水産魚介類種苗生産環境における微生物の挙動と管理. 海洋微生物とバイオテクノロジー (清水 潮編), 技報堂出版, 東京, pp. 167-183.
  - 13) NOGAMI, K., and M. MAEDA (1992) Bacteria as biocontrol agents for rearing larvae of the crab *Portunus trituberculatus*. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, **49**, 2373-2376.
  - 14) 山野井英夫・杉山瑛之 (1985) 種苗生産時の病害に関する研究, アユの初期斃死機構に関する研究. 昭和59年度魚病対策技術開発研究成果報告書, 1-25.
  - 15) 山本 淳 (1985) 人工種苗アユの腸内フローラに関する研究—I. 餌料, 特にシオミズツボワムシおよび飼育水の影響. 昭和59年度山梨県魚苗センター事報 (13号), 92-95.
  - 16) 林 孝一郎・木村俊夫・菅原 庸 (1975) アユの人工種苗生産における微生物学的研究—III, シオミズツボワムシおよびタマジンコの細菌汚染. 三重大水産学部研報, **2**, 81-91.
  - 17) 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.
  - 18) MAEDA, M., and A. HINO (1991) Environmental management for mass culture of the rotifer, *Brachionus plicatilis*. Rotifer and microalgae culture systems. Proceedings of a U.S.-Asia workshop. Honolulu, HI, 125-133.
  - 19) HAYASHI, K., T. KIMURA, and I. SUGAHARA (1974) *Microbiological studies on the artificial seedling production of ayu fish, Plecoglossus altivelis*—II, Bacterial populations in culturing water and diseased fish. *Bull. Fac. Fish. Mie Univ.*, **1**, 25-32.
  - 20) 林 孝一郎・木村俊夫・菅原 庸 (1976) アユの人工種苗生産における微生物学的研究—IV, シオミズツボワムシ及びタマジンコの汚染細菌除去について. 三重大水産学部研報, **3**, 87-91.
  - 21) 岩田一夫・石橋 制・北尾忠利・青木 宙 (1977) マダイ種苗生産過程におけるへい死の原因について—I. 昭和50年度宮崎水試事報, 267-273.
  - 22) 田畑和男・柄田 哲・M. S. RUIZ (1982) 海水によるアユ種苗生産の病害研究—II, *Vibrio anguillarum* の動態. 魚病研究, **17**, 205-212.
  - 23) 町田洋一・古沢 優 (1984) マダイ, クロダイ種苗生産におけるワムシ培養と *Vibrio* 属菌の増減および紫外線等を使用したワムシの除菌効果について. 昭和57年度石川県栽培漁業センター事報, 62-68.
  - 24) 田谷全康・室賀清邦・杉山瑛之・平本義春 (1985) 種苗生産過程の仔稚アユからの *Vibrio anguillarum* の検出. 水産増殖, **33**, 59-66.
  - 25) MUROGA, K., H. YASUNOBU, N. OKADA, and K. MASUMURA (1990) Bacterial enteritis of cultured flounder *Paralichthys olivaceus* larvae. *Dis. Aquat. Org.*, **9**, 121-125.
  - 26) 日本栽培漁業協会 (1995) 種苗生産技術の開発, ヒラメ. 日裁協事業年報平成5年度, 137-141.
  - 27) 日本栽培漁業協会 (1996) 種苗生産技術の開発, ヒラメ. 日裁協事業年報平成6年度, 121-127.
  - 28) 日本栽培漁業協会 (1997) 種苗生産技術の開発, ヒラメ. 日裁協事業年報平成7年度, 142-147.
  - 29) 日本栽培漁業協会 (1998) 種苗生産技術の開発, ヒラメ. 日裁協事業年報平成8年度, 133-146.