

# ガザミ種苗飼育水中のビブリオ科細菌密度に対する有用細菌株(Thalassobacter utilis PM4)添加の影響

誌名	養殖研究所研究報告 = Bulletin of National Research Institute of Aquaculture
ISSN	03895858
著者名	鈴木,満平 徳田,雅治 荒井,大介 山下,貴示 古澤,昭人
発行元	水産庁養殖研究所
巻/号	29号
掲載ページ	p. 135-139
発行年月	2000年3月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター  
Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council  
Secretariat



## ガザミ種苗飼育水中のビブリオ科細菌密度に対する 有用細菌株 (*Thalassobacter utilis* PM4) 添加の影響

鈴木満平・徳田雅治・荒井大介・山下貴示・古澤昭人

(1999年8月31日受理)

Effects of addition of cultured bacteria (*Thalassobacter utilis* PM4)  
on density of *Vibrionaceae* in rearing water for larvae  
of the swimming crab *Portunus (Portunus) trituberculatus*

Manpei Suzuki\*<sup>1</sup>, Masaharu Tokuda\*<sup>1</sup>, Daisuke Arai\*<sup>2</sup>,  
Takashi Yamashita\*<sup>3</sup>, and Akihito Furusawa\*<sup>4</sup>

A biocontrol technique, which is expected to repress the growth of pathogenic *Vibrionaceae* in a rearing seawater and to increase the survival rate of the crustacean larvae, has been applied to larval culture of the swimming crab (*Portunus (Portunus) trituberculatus*). We aim to verify the decrease of the density of *Vibrionaceae* caused by addition of the bacteria (*Thalassobacter utilis* PM4) in a biocontrol system, which was conducted on the 200 kℓ scale of two tanks. The test was started with 150 kℓ sterilized seawater, five million individuals of the swimming crab larvae, rotifers (*Brachionus rotundiformis*, 7 individuals/ml), diatoms (*Chaetoceros calcitrans*, 1000 cells/ml), and 16 ℓ of culture medium of the bacteria. Effects of the biocontrol technique for 5 days were examined from the relationships between numerical changes in heterotrophic bacteria, *Vibrionaceae* and protozoan. Additional bacterial culture medium, that is biocontrol technique, slightly promoted the increase of bacteria-predating protozoa, but did not serve to decrease significantly the density of *Vibrionaceae* in the present study.

*Key words* : Seeding production, Biocontrol, swimming crab, *Vibrionaceae*

自然海域での細菌密度はある一定の範囲に収まっており、その理由として細菌の増殖速度が有機物濃度に依存する一方で、常に細菌が原生動物による高い捕食圧に晒されていることが考えられている (Parsons *et. al.* 1996)。こうした細菌と原生動物の被食-捕食の関係が種苗飼育水環境でも

\*<sup>1</sup> 養殖研究所 (National Research Institute of Aquaculture, Nansei, Mie 516-0193, Japan)

\*<sup>2</sup> (株)日本栽培漁業協会 玉野事業場 (Tamano St. of Japan Sea Farming Association, Tamano, Okayama 706-0002, Japan)

\*<sup>3</sup> (株)日本栽培漁業協会 八重山事業場 (Yaeyama St. of Japan Sea Farming Association, Ishigaki, Okinawa 907-0451, Japan)

\*<sup>4</sup> (株)新日本気象海洋 環境創造研究所

(Institute of Environmental Ecology, Shin-Nippon Meteorological Oceanographical Consultant Co. Ltd., Ooigawa, Shizuoka 421-0212, Japan)

成立することを前提とし、飼育水に積極的に異種培養細菌を添加して原生動物密度を増加させるとともに、それらの捕食による種苗生産阻害細菌の密度低減を図る飼育法(以下、バイオコントロール法)がMaeda(1994)によって考案された。現在、バイオコントロール法は日本栽培漁業協会玉野事業場でのガザミ(*Portunus (Portunus) trituberculatus*, 以下ガザミ)の種苗生産に用いられている(野上ら1992)。

一方、バイオコントロール法の開発の端緒は昭和60年代に同事業場で頻発したビブリオ病によるガザミ種苗の生産阻害への対策であり、現在使用されている添加細菌株(*Thalassobacter utilis* PM4, 以下、PM4)は*Vibrio anguillarum*の増殖を直接抑制することができることとされている(Maeda1994)。Maeda(1994)は、ガザミ種苗飼育水へのPM4の添加により飼育水中のビブリオ菌密度が低下する可能性を示したが、論文にはPM4無添加の対照試験結果が示されていないので、実際にビブリオ菌密度の低下とPM4添加が関係しているのかは不明である。本試験ではMaeda(1994)と同様にガザミ種苗生産水槽を用い、PM4無添加の対照区を設定した上で、バイオコントロール法においてPM4の添加によりビブリオ科細菌密度が実際に低減しているかどうかを検証することを目的とした。

試験は平成10年5月に実施した。容量が200klの生産水槽(10m×10m×2m)2基に砂濾過海水を150kl注水、有効塩素濃度5ppmで24時間消毒し、試験開始直前にチオ硫酸ナトリウムで中和した。早朝に、それぞれの水槽にガザミふ化幼生を約500万尾収容し、同玉野事業場で行われている給餌法に基づき、砂濾過海水でよく洗浄したワムシ(*Brachionus rotundiformis*, 以下ワムシ)を7個体/ml、別途培養された珪藻(*Chaetoceros calcitrans*)を約1000細胞/mlとなるように添加した。試験区にはPM4を $10^9$ CFU/ml程度の密度にまで増殖させた培養液を16l添加し、対照区には添加しなかった。その後5日間、紫外線照射処理( $10000 \mu W \cdot s/cm^2$ )した海水を毎日10または15kl注水した。また、対照区では午前と午後1回ずつ残存ワムシ密度を測定し、始めの3日間は7個体/ml、また続く2日間は12個体/mlとなるようにワムシを給餌するとともに、試験区へは対照区と同じ量のワムシを給餌した。また、試験区へはPM4を $10^9$ CFU/ml程度の密度にまで増殖させた培養液を毎日午前1回、16lを添加した。1回につき添加したPM4菌数は、飼育水に現存した一般従属栄養細菌数の20から100%の範囲であった。本試験期間中の飼育水温はガザミ幼生の飼育適水温とされる24~26℃の範囲内であった(ガザミ種苗生産研究会1997)。

試験期間中は1日に2回午前7時30分と午後5時に、水槽の中心から2.5m離れた部分の飼育水を内径50mmの塩化ビニール製のパイプで柱状に採水し分析に供した。飼育水中の一般従属栄養細菌およびビブリオ科細菌の生菌数は、採水後直ちに寒天培地平板法(日本海洋学会1990)により測定した。原生動物類(従属栄養微細鞭毛虫類および繊毛虫類の合計数)については、採水後直ちに25%グルタルアルデヒドを25分の1容量添加して固定し、分析に供するまで冷暗所に保存した。従属栄養微細鞭毛虫類については試料をあらかじめDAPI(4'-diamidino-2-phenylindole)及びFITC(fluorescein isothiocyanate)で染色し(Sherr *et. al.* 1983)、蛍光顕微鏡下でクロロフィル蛍光の有無で従属栄養体と独立栄養体の区別を行い、次に従属栄養体についてサイズ・細胞質・鞭毛の有無を指標として細菌類と識別した。繊毛虫類については染色せずに生物顕微鏡下で個体数を計数した。原生動物の分類・同定は特に行わなかった。なお、試験期間中、ガザミ種苗における疾病の発生は認められなかった。

Fig.1に飼育水中の一般従属栄養細菌、ビブリオ科細菌、原生動物の各密度の経時変化を示した。

一般従属栄養細菌密度については、飼育開始1日目から5日目まで、対照区では  $6 \times 10^5 \sim 2 \times 10^6$  CFU/ml、試験区では  $4 \times 10^5 \sim 3 \times 10^6$  CFU/ml であり、両区ともほぼ同じ値で安定して推移した。ビブリオ科細菌密度は対照区、試験区とも飼育開始後1日間は  $1 \times 10^5$  CFU/ml 以上の密度で、試験区の密度は対照区より一桁程度高かった。その後は両区とも減少し、 $10^4$  CFU/ml 程度で安定して推移した。また、ビブリオ科細菌密度の変化を細菌相における同菌の存在割合で評価するために、一般従属栄養細菌密度に対するビブリオ科細菌密度の比の経時変化をみた (Fig.2)。ビブリオ科細菌の存在比は飼育開始から24時間以内では両区とも数10%であったが、その後は

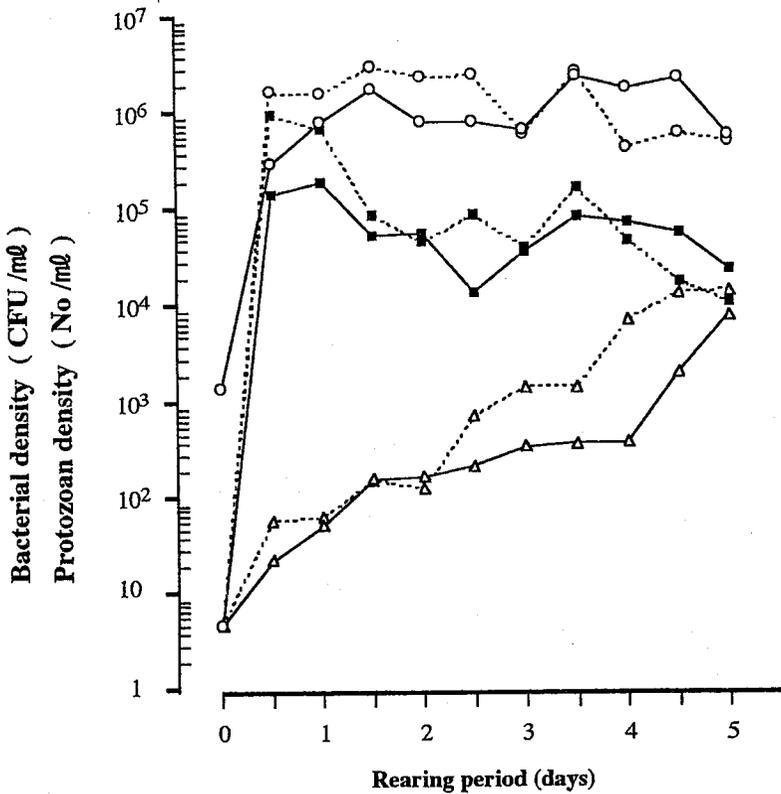


Fig.1. Fluctuation of bacteria and bacteria-predating protozoan in rearing water of *Portunus (Portunus) trituberculatus*.

- heterotrophic bacteria / control
- heterotrophic bacteria / test
- *Vibrionaceae* / control
- *Vibrionaceae* / test
- △— protozoa (heterotrophic microflagellates and ciliates) / control
- △--- protozoa (heterotrophic microflagellates and ciliates) / test

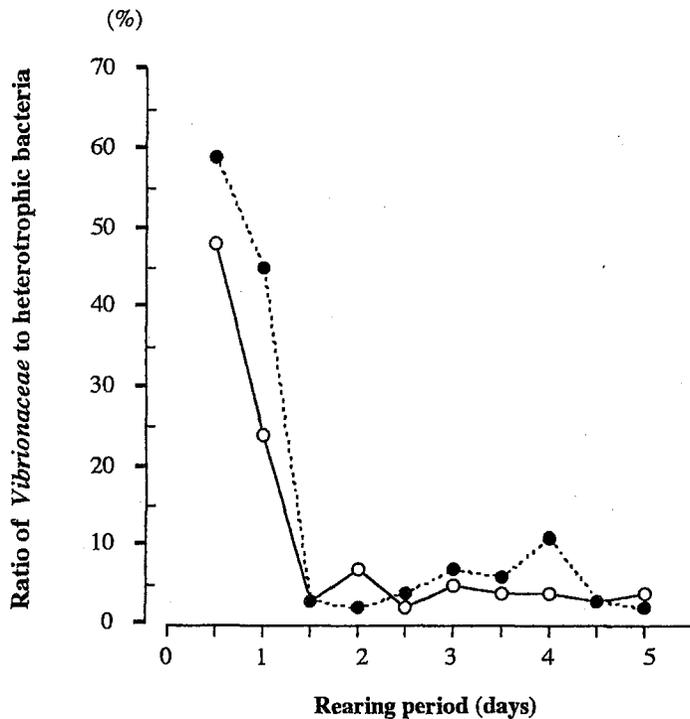


Fig.2. Fluctuation of ratio of *Vibrionaceae* to heterotrophic bacteria in rearing water of *Portunus* (*Portunus*) *trituberculatus*.

—○— control,    -●- test

両区において急速に減少して数%以内に収束し、PM4の添加により明らかにビブリオ科細菌の存在比が低下すると評価できるような差異を認めなかった。原生動物については、両区とも飼育開始後2日目までは同じような速度でゆっくり増え続けた。その後、対照区の増殖速度は鈍化した。試験区では初期の増殖速度を持続しながら、4日目に $10^4$ 個体/ml程度の密度に到達した。対照区では、2日目以降、試験区よりも低い密度で推移した。

両区とも原生動物が増え続けたのに対し、一般従属栄養細菌密度はほぼ一定していた (Fig.1)。このことは、毎日添加されたワムシ由来の有機物やガザミ幼生の代謝産物としての有機物等が新たな細菌の増殖を促し、それらを餌料とする原生動物の増殖を誘導した結果と考えられた。また、試験区ではワムシに加えてPM4をも添加したため、原生動物の増殖が対照区より活発になったと推察された。この様に、PM4の添加による飼育水中の微生物食物連鎖の活性化はある程度は認められた。一方で、期待されたビブリオ科細菌密度低減効果は認められなかった。

この様に本試験では、バイオコントロール法による飼育水中のビブリオ菌の密度低減効果の可能性を指摘したMaeda (1994)の報告とは異なる結果を得た。効果が実際に期待できるのかどうかを明らかにするには、試験事例の積み重ねが今後も必要である。また、Maeda (1994)は、ビブ

リオ病対策としてのバイオコントロール法の有用性をガザミ種苗の生残率の上昇で評価した。生残率の上昇にはPM4による種苗の生体防御機能の亢進やビブリオ病原菌に対するPM4の抗菌性といった要因も背景として考えられる。これらも今後の、検討課題である。

本研究は農林水産省のバイオルネッサンス計画の一環として行われた (BRP-99-II-B-2)。

## 文 献

- ガザミ種苗生産研究会 1997. ガザミ種苗生産技術の理論と実践 pp.63-74, (株)日本栽培漁業協会, 東京.
- Maeda, M.1994. Biocontrol of the larvae rearing biotope in aquaculture. Bull.Natl.Res.Inst. Aquaculture, Suppl.1:71-74.
- 日本海洋学会 1990, 沿岸環境調査マニュアルII. pp.275-280, 恒星社恒星閣, 東京.
- 野上欣也・前田昌調 1992. バイオコントロール法によるガザミ種苗生産. 養殖. 29(4): 146-148.
- Parsons, T.R., Takahashi, M., and Hargrave, B. 1996. 動物プランクトン/生物サイクル pp.57-64, 生物海洋学3 (高橋正征・古谷 研・石丸 隆 監訳), 東海大学出版会, 東京.
- Sherr, E. B. and Sherr, B. F. 1983. Double-staining epifluorescence technique to assess frequency of dividing cells and bacterivory in natural populations of heterotrophic microprotozoa. Appl. Environmental microbiol., 46:1388-1393.