

マガキ *Crassostrea gigas* 幼生飼育水中の 細菌相の変化について

雨村明倫・小西達也^{*1}・沖増英治

福山大学内海生物資源研究所

Change in Bacterial Flora in the Rearing Water of Pacific Oyster (*Crassostrea gigas*) Larvae.

Akinori Amemura, Tatsuya Konishi^{*1} and Eiji Okimasu

(Research Institute of Marine Bioresources, Fukuyama University, Ohama-cho, Innoshima, Hiroshima 722-21, Japan)

Report Res. Inst. Marine Bioresources, Fukuyama Univ., No. 7, 29-39 (1996).

Colony types of bacteria isolated from the rearing water of Pacific oyster (*C. gigas*) larvae were classified into eight (W1, W2, W3, WS1, WS2, P, Y1, Y2) on the basis of their color, shape, gram staining and physiological properties. Bacteria with type W1 colony were found preferentially in the water during the whole period of rearing, and other types of bacteria appeared in large numbers in the first or latter half of the rearing period. However, looked as a whole, these bacteria are present in well-balanced proportion in the rearing water and did not give a bad effect on the growth of larvae. When streptomycin was added to the rearing water to control the bacterial flora, W1 type of bacteria predominated at the latter stage of the culture, but the oyster larvae grew well under this condition. Addition of sodium nifurstyrenate decreased the growth of most types of bacteria significantly, however, only bacteria with colony type W2 predominated in the rearing water, resulting in bad growth of the larvae and leading them to death. These results suggest that the balanced growth of useful or harmless

^{*1}現住所：(株)ニチノ一緑化 〒101 東京都千代田区岩本町 2-5-12

bacteria for larvae prevents the preferential growth of harmful bacteria in the rearing water.

自然環境に左右されない安定したマガキの種苗生産を行うために開発されたマガキ幼生の人工飼育・人工採苗技術は、近年、急速に進歩を遂げ、幼生の餌料生物の安定供給などの残された問題があるものの、ほぼ確立されたといえる。また、成長、身入りのよい三倍体マガキの作成・飼育研究も盛んに行われている¹⁾。一方、これらの進歩にも拘わらず、幼生の飼育がしばしば不調に陥る場合があり、その際、飼育水中に高濃度の細菌が検出されるため、餌料生物の無菌培養、飼育水のメンブレンフィルターによる除菌などにより細菌の混入を極力防ぐ飼育の改良法が試みられている。しかし、無菌化を進めると、ある特殊な細菌のみが優先的に繁殖し始め、幼生の飼育にかえって悪い結果をもたらすことも知られるようになってきた。

魚介類の種苗生産において、飼育水環境を安定させるための”水作り”は重要な課題であり、その中で、飼育水中の微生物相、特に細菌相を管理するバイオコントロール法は近年注目されている。有用な細菌を飼育水に添加してクルマエビ、ガザミなどの幼生を安定に生産させた例も報告されている^{2,3)}。

本研究ではマガキ三倍体の飼育水中の細菌を経時的に分離、分類し、それらが幼生の発育、飼育環境にどのような影響を及ぼしているかを考察をした。

実験材料および方法

マガキ幼生飼育法

マガキ *Crassostrea gigas* の授精、三倍体作出および幼生の飼育は広島県栽培漁業協会（広島県竹原市）で、同協会の職員により行われた。親ガキを加温飼育し、生殖巣の成熟期に切開法により採卵、採精を行い、媒精させた。受精卵をカフェイン処理した後、得られた三倍体の浮遊幼生（D型幼生）を対象として飼育試験が行われた。

実験I（1993年7月3日～7月27日）：海水 18 kl の入った 20 m³ タンクに、孵化 24 時間後の浮遊幼生を 2.7 個体/ml となるように収容した。水温は 25°C で、100 ml/min の通気を行いながら、止水、遮光状態で飼育を行った。幼生収容日を 0 日令とし、5 日令、9 日令、12 日令、23 日令に全換水を行った。飼育海水は糸巻き型のカートリッ

ジ・フィルター（孔径 $1\mu\text{m}$, Advantec）で濾過したものをを用いた。餌料生物としてハプト藻 *Pavlova lutheri* を用いた。給餌細胞密度は、実験開始時を 5×10^3 cells / ml とし、3日毎に 2.5×10^3 cells / ml ずつ増加して、24日令で 2.5×10^4 cells / ml となるようにした。

0日令の幼生の平均殻高は $73\mu\text{m}$ であった。殻高が $140\mu\text{m}$ となった8日令（幼生密度、0.33 個体/ml）に選別を行い、大きい個体を取り除いた。小さい個体を 2m^3 タンク（水量、 1800l ）に移し、飼育を続けた。選別後の幼生密度は 2.1 個体/ml であった。12日令で再び選別を行い、大きい個体を除いた。幼生密度は 0.79 個体/ml となった。幼生の平均殻高は、15日令が $180\mu\text{m}$ 、18日令が $210\mu\text{m}$ 、21日令が $280\mu\text{m}$ 、23日令が $340\mu\text{m}$ であり、飼育期間中順調に成育を続けた。23日令の幼生密度は 0.29 個体/ml であった。

選別して取り除いた大きい個体はそれぞれ別のタンクで飼育し、いずれも順調に生育したが、今回、それらについては飼育水の細菌の分離・同定を行わなかった。

実験II（1993年9月14日～9月20日）：次の3試験区を設けた。(1) ストレプトマイシン区；10 ppm のストレプトマイシン硫酸塩（Nacalai Tesque）を飼育水に添加。(2) エルバージュ区；10 ppm のニフルスチレン酸ナトリウム（エルバージュ、上野製薬）を飼育水に添加。(3) 対照区；薬剤無添加。各試験区とも 300l の飼育水の入った 500l 容のパンライト水槽を用いた。幼生の収容密度は 3.5 個体/ml とした。飼育は全期間、止水状態で行った。その他の飼育方法は実験Iと同様である。

飼育水中の細菌の分離および同定法

2日毎に飼育水をサンプリングし、適宜希釈した後、その 0.2ml を Anderson 寒天培地 [2.5g ペプトン (Difco), 2.5g 酵母エキス (Difco), 0.1g $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1000ml 海水, 15g 寒天, pH7.4 ~ 7.6] にまいた。 25°C 、5日間保温後、生じたコロニーを色、形態で分類し、それぞれの数をカウントした。代表的な菌株をコロニー分離を繰り返すことにより単離した。グラム染色、アピ 20NE 同定キット (Bio Merieux S. A., France) を用いて単離した菌株の同定を試みた。飼育水をサンプリングする日が換水日である場合は、換水する前にサンプリングを行った。

結果および考察

実験 I

飼育水から分離した細菌のコロニーの色は, white, pink, yellow の三色に識別された。一方, コロニーの形状は round, irregular および不規則に広がって成育する spread に分けられ, 粘質物を形成していると思われる slimy なものも観察された。また, 大きさからは large, medium, small の3種類に分類された。これらの特徴の組み合わせから飼育水から分離した細菌のコロニーをとりあえず Table 1 に示したように I ~ X の10のタイプに分類した。それらのコロニーの写真を Fig. 1 に示している。

Table 1. Classification of bacteria isolated from the rearing water of Pacific oyster larvae

Isolated bacteria	Colony type		Reclassification based on Api 20NE
	Color	Morphology	
I	White	Small, round	W1
II	White	Medium, round	W1
III	White	Medium, slimy	W1
IV	White	Large, round	W2
V	White	Medium, irregular	W3
VI	Pink	Small, round	P
VII	White	Small, spread	WS1
VIII	White	Large, spread	WS2
IX	Yellow	Medium, round	Y1
X	Orange	Medium, round	Y2

次いで, これらの菌株をグラム染色とアピ 20NE 同定キットを用いた生理的試験により特徴付けた (Table 2)。その結果, タイプ IX を除くすべての菌株はグラム陰性であることがわかった。また, タイプ I ~ III の菌株は硝酸塩を還元し, ゼラチンを溶解し, リンゴ酸, クエン酸を資化するなど共通の生理的性質を有し, コロニーの形状も似ているため, 近縁種であると思われる。タイプ V とタイプ X の菌株は共通の生理的性質を有していたが, コロニーの特徴が非常に異なるため, 異なる種であると思われる。他の

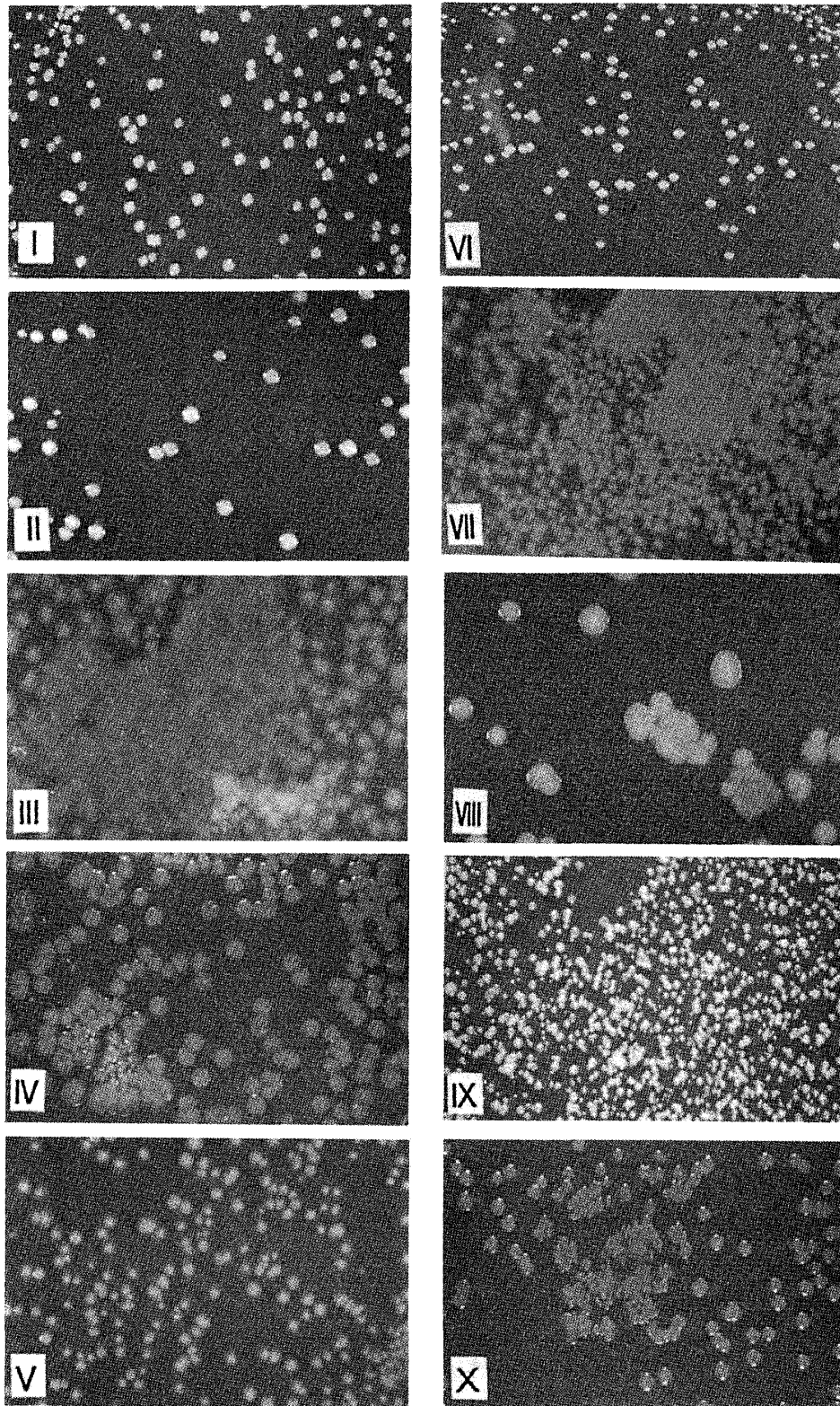


Fig. 1. Colony type of bacteria isolated from the rearing water of Pacific oyster larvae.

Table 2. Api 20NE test for bacteria isolated from the rearing water of Pacific oyster larvae

Bacteria	NO ₃	TRP	GLU	ADH	URE	ESC	GEL	PNPG	GLC	ARA	MNE	MAN	NAG	MAL	GNT	CAP	ADI	MLT	CIT	PAC	GRAM
I	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	±	-	-
II	+	-	-	-	±	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-
III	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-
IV	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
V	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
VI	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
VII	-	-	-	-	-	-	±	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-
VIII	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
IX	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
X	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Abbreviations: NO₃, nitrate reduction; TRP, indole production from tryptophan; GLU, acid production from glucose; ADH, arginine dihydrolase; URE, urease; ESC, glucosidase; GEL, protease; PNPG, b-galactosidase; GLC, glucose assimilation; ARA, arabinose assimilation; MNE, mannose assimilation; MAN, mannitol assimilation; NAG, N-acetyl-glucosamine assimilation; MAL, maltose assimilation; GNT, gluconate assimilation; CAP, caprylate assimilation; ADI, adipinate assimilation; MLT, malate assimilation; CIT, citrate assimilation; PAC, phenyl acetate assimilation; GRAM, gram staining.

菌株はそれぞれ異なった生理的性質とコロニーの特徴を持っているため、明らかに異なる種とみなされる。そこで、カキの飼育水中の細菌相を簡略化して分類するために、タイプ I ~ III に属する細菌を一つのグループにまとめ、Table 1 に示したように 8 つのタイプ (W1, W2, W3, P, WS1, WS2, Y1, Y2) に再分類した。

3 倍体のマガキ幼生は、前述のように飼育期間中順調に生育した。1 日おきにサンプリングした飼育水をプレートし、5 日後に出現するコロニー数をタイプ別に計測した結果を Fig. 2 に示す。飼育初期にはタイプ P, 次いで、タイプ WS1, Y1 のコロニーが一過的に優勢出現するが、これらはタイプ P が再び中期 (14 日令時) に優勢的に出現する以外、中期、後期飼育時に出現しなかった。一方、タイプ W2, W3 のコロニーは初期には見られず、後期に多く見られた。また、タイプ WS2, Y2 のコロニーは飼育期間を通じて出現はわずかであった。しかし、タイプ W1 のコロニーは数において他のコロニータイプを凌ぎ、しかも、全飼育期間中に見られた (中期、後期に特に多い)。前述のように、W1 は形状で識別しうる 3 種のコロニータイプの混合であり、生理的性質の類似した複数種の細菌より成り立っていると思われるが、これらの細菌種は飼育水中に優先的に存在しており、マガキ幼生の成育には無害であるか、あるいは、成育に良い影響を与えているものと考えられる。

実験 II

マガキの飼育水中に雑菌が繁殖し、それが原因ではないかと思われる飼育の不調をしばしば経験する。そのため、飼育水中に薬剤を投入して、雑菌の繁殖を抑える試みが行われている。本実験ではストレプトマイシン、エルバージュを添加してマガキ幼生の飼育を行い、飼育水中の細菌相を調べ、無添加飼育のものと比較した。

各試験区の幼生の飼育状況は、ストレプトマイシン区は成長、生存率共に良く、エルバージュ区は成長、生存率共に悪かった。一方、対照区の成長はストレプトマイシン区と同様良好であったが、生存率は同区にやや劣った。

飼育水中の細菌相の分布を Fig. 3 に示す。対照区ではタイプ W1, W2, W3, WS1, Y1, Y2 の細菌が期間中バランス良く繁殖しており、また、ストレプトマイシン区ではタイプ W1, W2, W3, P, Y1 の細菌が主なものであった。抗生物質の添加によりやや細菌種が減少しているが、細菌数そのものはそれほど減少していない。特に、飼育の後半には、タイプ W1 の細菌群が優先的に繁殖しており、この菌はストレプトマイシンに抵抗性を示すものと見られる。この試験区は幼生の成長、生存率が良好であったことから、W1 は実験 I においても見られたように飼育水中に常時存在し、幼生の成育には無害あるいは良好な影響を与えていると思われる。一方、エルバージュ区は繁殖してくる細菌種が少なく、タイプ W2 の細菌のみが圧倒的に優先繁殖していることがわかる。この試験区

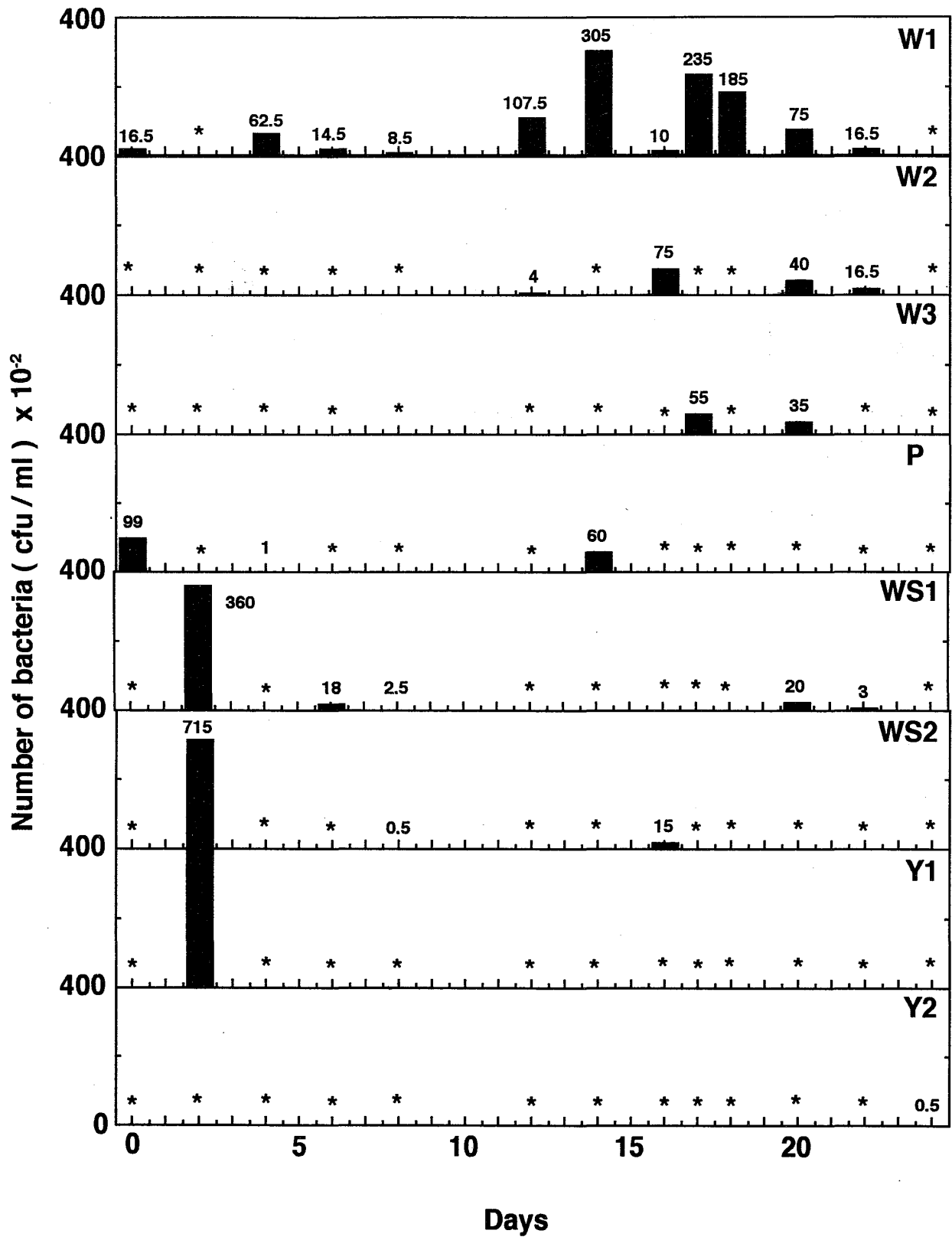


Fig.2. Distribution of bacteria in the rearing water of Pacific oyster larvae (Expt. 1).

* ; not detected ($< 0.5 \times 10^2$ cfu/ml).

Colony type of bacteria

Days		2	4	6
Control	W1	15	18	7
	W2	5	18	2
	W3	8	21	11
	P	*	*	*
	WS1	26	7	5
	WS2	*	*	*
	Y1	14	4	*
	Y2	*	*	8
	Streptomycin	W1	6	18
W2		31	5	*
W3		20	9	17
P		*	7	3
WS1		*	*	*
WS2		*	*	*
Y1		*	2	1
Y2		*	*	*
Nifurstyrenate		W1	1	1
	W2	2360	1922	1748
	W3	4	4	11
	P	*	*	2
	WS1	*	*	*
	WS2	9	2	1
	Y1	*	*	*
	Y2	*	*	*

Number of bacteria (cfu/ml) x 10⁻²

Fig. 3. Distribution of bacteria in the rearing water of Pacific oyster larvae (Expt. 2).

* ; not detected (< 1 x 10² cfu/ml).

は幼生の成長、生存率が極端に悪く、試験に用いた濃度のエルバージュが幼生の成育に悪い影響を与えるとは考えにくいので、W2 の異常な繁殖が幼生の発育停止の原因となっているものと思われる。

以上の結果より、本実験で行われたマガキ幼生飼育において、その飼育水中には約 10 種類の細菌群が主に繁殖しており、飼育期間中その細胞数はかなり変動していることが明らかとなった。飼育水に薬剤を投入して細菌の繁殖を抑えると、薬剤に抵抗性を持つ細菌のみが優先増殖し、エルバージュ区で見られたようにそれが幼生の成育に悪い影響を与える可能性が認められた。従来より、マガキ幼生の飼育は不安定であり、その一因は飼育水中の有害細菌であるとされていた。そこで飼育水から細菌を排除するために、餌料植物プランクトンの純化の徹底、メンブランフィルターによる飼育水の精密濾過などが試みられた。しかし、飼育水を完全に無菌化することは不可能で、無菌化が進むほど飼育水中に有害な細菌が単独増殖してくるという現象が見られた（未発表結果）。

本実験ではそのような観点から、飼育水の調製に海水をメンブランフィルター（0.2 μm ポアサイズ）で濾過せず、糸巻き型のカートリッジフィルターで濾過するにとどめている。飼育水中に種々の細菌がバランス良く繁殖し、その結果有害と思われる細菌の繁殖を抑えられるような飼育法の方がうまくいくのではないかと思われる。海の中には多くの細菌が棲息していて、細菌が分泌するビタミンなどが他の生物の発育に大きく貢献している。マガキ幼生の飼育水に有用な細菌を積極的に導入することは、栄養的見地からのみならず、有害な細菌の繁殖を抑えるという意味も含めて、今後の興味ある検討課題である。ビタミン群が豊富である光合成細菌 PSB (*Rhodobacter capsulatus*) は魚介類の補助餌料として検討されており、⁴⁻⁶⁾ アンモニアの資化能力が高いことから飼育水の浄化、安定化にも役立つとされている⁶⁾。著者らは PSB をマガキ幼生の餌料として用いると、幼生の生存率が高まるという結果を報告した⁷⁾。PSB や本実験で得られた W1 タイプの細菌を飼育水に加えた飼育水作りを考えてみたい。

要 約

三倍体マガキ (*C. gigas*) 幼生の飼育水中から細菌の分離を行い、コロニーの色、形状、グラム染色、生理的性質から、それらの細菌を 8 つのタイプ (W1, W2, W3, P, WS1, WS2, Y1, Y2) に分類した。飼育水中には W1 の数が多いものの、これらの細菌は比較的バランス良く棲息しており、幼生の生育に悪い影響は与えなかった。飼育水中の細菌相をコントロールする目的でストレプトマイシンを添加すると、細菌種がやや減り、W1 が飼育後期に優先的に繁殖してきたが、幼生の発育には全く影響がなかった。一方、エ

ルバージュを添加した場合、飼育期間中 W2 のみが他の細菌を抑えて圧倒的に繁殖し、幼生の発育が抑えられ、幼生のほとんどが死滅してしまった。これらのことから飼育水中には有益あるいは無害な細菌がバランス良く生育していることが必要で、そのことが有害な細菌の繁殖を抑えていることが示唆された。

謝 辞

マガキ幼生飼育水中の細菌相の研究に便宜をはかっていただきました広島県栽培漁業協会の方々にお礼申し上げます。

文 献

- 1) 「特選広島がき」実用化事業：広島県水産試験場事業報告，広島県水産試験場， pp. 1-26 (1995).
- 2) 今村茂生・梶田拓治：栽培技研，1，35-46 (1972).
- 3) 野上欣也・前田昌調：海洋微生物とバイオテクノロジー，清水 潮編，技報堂出版， pp. 169-183 (1991).
- 4) 小林達治・川村厚生・大家正太郎・三上郷司・中西 弘・村田清美・衣笠美弘・河杉忠昭： *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.*, 35, 1021-1025 (1969).
- 5) M. Kobayashi and S. Kurata： *Process Biochem.*, 13, 27-30 (1978).
- 6) 萩野珍吉：発酵と工業，36，836-841 (1991).
- 7) 雨村明倫・阪本憲司・沖増英治・松本正樹：福山大学内海研報，No. 4，23-33 (1993).