

餌料生物としてのワムシにおける細菌汚染の軽減に関する研究

山野井英夫

Studies on the Methods for Reduction of Bacterial Load in Rotifers

Hideo YAMANOI

SUMMARY

The seed production activities leading to sea farming program have now been conducted for about 80 species of marine fish and shellfish in Japan. The progress of seed production of marine fish has been supported by various technical developments. Among these, the introduction of rotifers (*Brachionus* species) into hatcheries as a start feed for larval fish is one of the most important developments. But ironically, cultured rotifers are often heavily contaminated with bacteria and sometimes cause intestinal infections in larval fish that fed rotifers especially when they are loaded dominantly with *Vibrio* species.

In the present study, elimination methods of bacteria from rotifers cultured for mass seed production of various marine fishes and ayu (*Plecoglossus altivelis*) were investigated. As a result some effective methods including chemical (sodium nifurstyrenate: NFS) bath treatment were developed. Effects of bacterial load of rotifers with different quantity and quality (flora) on the growth, survival rate, and intestinal flora of larval fish were examined. The fate of bacteria, which were artificially housed by immersion in rotifers as the dominant flora, was studied. The duration of efficacy of NFS bath and effect of simultaneous exposure of rotifers to nutritional additives on the efficacy of NFS bath were also examined. Finally, methods to increase productivity in seed production of marine fishes were discussed.

Part I

Informations about occurrence of mortality and kinds of feed used for seed production of ayu were collected and analysed by a questionnaire to 35 governmental and private ayu hatcheries in 1984 ~ 1986.

- 1) Rotifers and artificial diets were used in all hatcheries. Brine shrimp (*Artemia salina*), yolk of chicken eggs, and water flea were used more frequently in private hatcheries than in public hatcheries. Rotifers tended to be administered to ayu for long period beyond necessary term.
- 2) Mass mortalities were recorded in 41.2 ~ 51.4 % ayu hatcheries every year.
- 3) The frequency of mass mortalities in hatcheries where live diets were medicated was less than half of that in hatcheries where medication was not applied. From these results, it was considered that some bacteria in live diets were associated with mortality of ayu larvae.

Part II

Effects of NFS bath, ultraviolet irradiation, and freezing on the reduction of bacteria associated with rotifer or brine shrimp were investigated.

- 4) NFS bath (1 mg/l, 4 h) of rotifer did not reduce the number of bacteria which were estimated by culturing on ZoBell's 2216e agar. However, number of bacteria on BTB teepol agar (mainly belong to the genus *Vibrio*) decreased from 10^8 CFU/g to 10^5 CFU/g. Thus, NFS bath of live diets was thought to be effective to reduce mortality of larval fish by lessening bacterial load of rotifers.
- 5) Ultraviolet irradiation tested in this study did not reduce the number of bacteria in rotifers.
- 6) Bacterial number (BTB teepol agar) of rotifer and brine shrimp nauplii decreased from 10^8 CFU/g to $10^3 \sim 10^5$ CFU/g during 1 month of freezing (-15°C). *Vibrio* species were found to be more sensitive than *Moraxella* and *Pseudomonas* species against freezing.

The two fish pathogenic bacteria, *Vibrio anguillarum* and *V. ichthyocentri*, artificially housed in rotifers could not survive for long period (30 ~ 40 days) of freezing (-15°C).

These data indicated that freezing is one useful method to reduce bacterial load in live diets, although quality of diets and feeding efficiency larval fish would be lowered by freezing.

Part III

It has been reported that the rotifers cultured for seed production of marine fish contain bacteria consisting mainly of *Vibrio*, *Pseudomonas*, and *Moraxella* at about $10^7 \sim 10^8$ CFU/g. In order to prepare rotifers which were dominated by known bacteria, the rotifers, whose original bacteria were inactivated by previous treatment with penicillin G and streptomycin, were exposed to cell suspensions of 10 strains of bacteria (*Vibrio*, *Pseudomonas*, and *Moraxella*) isolated from rotifers.

- 7) The concentration of each test bacterium rapidly reached $10^7 \sim 10^8$ CFU/g in the rotifers when exposed to its suspension at 1.0×10^8 CFU/ml. But, after transferred to seawater, the concentration of *Pseudomonas* and *Moraxella* strains decreased from $1.2 \sim 7.1 \times 10^7$ CFU/g to $1.7 \sim 5.2 \times 10^6$ CFU/g in 4 h. Additional experiments revealed that these decrease were caused mainly by inactivation or digestion by rotifers. On the other hand, the concentration of *Vibrio* strains never decreased in rotifers.

These results suggest that *Vibrio* was different from other bacteria in its affinity or resistance to rotifers and that *Vibrio* and *Moraxella-Pseudomonas* are a parasite (or commensal) and a feed, respectively, to rotifers.

Part IV

The effects of feeding of rotifers and brine shrimp which were treated with NFS bath or freezing on the growth, survival rate, and the aerobic bacterial intestinal flora of black seabream (*Acanthopagrus schlegelii*) larvae and ayu larvae were investigated.

- 8) Intestinal bacterial counts on ZoBell's agar in black seabream larvae were not different among the three groups after 10 and 15 days, however, after 42 days bacterial counts in the fish fed with medicated live diets (1.3×10^3 CFU/fish) and fed with frozen diets (5.3×10^2 CFU/fish) were much lower than that of control group (3.6×10^6 CFU/fish). The dominance of *Vibrio* species among intestinal flora was apparently higher in the control group (100%) than the two test groups (28 or 29%).
- 9) The average total length and survival rate of the fish (46-day-old) at the end of the experiment were 16.5 mm · 41%, 14.0 mm · 73%, and 17.6 mm · 26% in test I (NFS bath), II (freezing), and III (control), respectively. There were no differences in the suffocation tolerance (handling test) among them. From these results, frozen rotifers and brine shrimp nauplii seem to be superior as diets for black seabream larvae.
- 10) In the experiment of ayu using 3 fish groups (I: NFS-treated, II: frozen, III: non-treated live diets), average of bacterial counts (ZoBell's agar) through the experimental period (80 days) were 1.1×10^4 , 4.8×10^3 , and 5.0×10^4 CFU/fish, in the groups I, II, and III, respectively. Survival rates in the three groups at the end of the experiment were 78, 25, and 97%, respectively.

11) *Vibrio* (55.2 ~ 67.9%) constituted dominant bacteria in all the ayu groups, the differences among groups being small on the average. Totally, expected good results in rearing of ayu larvae by treating live diets were not obtained in this experiment.

Part V

Duration of effectiveness of NFS bath and effects of simultaneous bath with nutritional additives (n-3 HUFA) on bacterial populations in rotifers were investigated.

12) Bacterial counts of rotifers on TCBS agar decreased from $10^6 \sim 10^7$ CFU/g to $10^3 \sim 10^5$ CFU/g by NFS treatment (5 mg/l) for 3 h. But the bacterial counts increased to 10^7 CFU/g 6 h after the medicated rotifers were transferred to seawater.

13) The efficacy of 3h-NFS bath was partially inhibited by the simultaneous bath with the nutritional additives used, however, the density of *Vibrio* bacteria (TCBS counts) of rotifers decreased to $10^4 \sim 10^5$ CFU/g, irrespective of inhibitory effects of the additives, after 5 h of NFS bath.

Part VI

Methods for reduction of bacterial load in live diets and methods for improvement of survival rate of larval fish in seed production were discussed.

It was considered that the reduction of bacterial count of live diets would lead to the improvement of mass seedling production. For that purpose NFS bath and freezing of live diets are recommended although both methods have their own shortcomings.

キーワード：ワムシ，細菌汚染，餌料生物

緒 論

日本栽培漁業協会が平成11(1999)年に発行した資料¹⁾によると、昭和52年度に全国の種苗生産機関あわせて11種しかなかった生産魚種(アユ*Plecoglossus altivelis*を含まない)は、昭和60年度(35種)まで急速に増加した後、一段落している(平成9年度, 38種)。しかし、生産数にみられる増加傾向は止どまるどころを知らず、昭和52年度に全魚種合計で1,035万尾しかなかった生産数が、昭和60年度に5,117万尾、平成9年度には9,982万尾にまで達している。これに加えて後述するように、アユ人工種苗の生産数は現在1億尾以上もあると推定され、合わせると2億尾近くにも達する魚類種苗が人工的に生産されていることになる。しかし、アユやマダイ*Pagrus major*といったいわば古典的な魚種をも含めて実は今なお数多くの大量斃死例が記録されており、多くは原因さえも明らかにされていないのが実状である²⁻⁴⁾。

歴史を振り返ってみると、人工生産の試みは、例えばアユでは大正時代にまで遡ることができるという⁵⁾。しかし、それらは魚類学的あるいは博物学的な興味の対象レベルにとどまっていたようで、アユにせよマダイにせ

よ、人為的に数多くの稚魚を育て上げて河川あるいは海域に放流しようとする試みに確かな燭光が見え始めたのは1960年代も後半に入ってからであった。当時の報告^{6, 7)}中には、シオミズツボワムシ*Brachionus plicatilis*や淡水産のツボワムシ*B. calyciflorus*に関する記載が既に見られるし、「工場生産的規模でのマスプロ化」なる鶴川⁷⁾の言葉には、マダイの大量種苗生産の実現にかけ現場技術者の強い意気込みが感じられる。

アユおよび海産魚の種苗生産に飛躍的な進展をもたらした最大の要素が1960年代後半の初期餌料へのシオミズツボワムシの導入であったことは間違いない⁸⁾。しかしながら、仔魚の飼育水に毎日5個体/ml以上投与する必要があったにもかかわらず、シオミズツボワムシの最大培養密度自体が5~20個体/mlでしかなかったために、長期間にわたって大量に供給しつづけることが不可能であった。シオミズツボワムシの培養密度を飛躍的に高めない限り、大量種苗生産の糸口はつかめないとみられた。

しかし、この問題は餌料として意外なものを投与することで解決されることになった。平田・森⁹⁾が、それまでの植物プランクトンに替えて市販のパン酵母

*Saccharomyces cerevisiae*を導入することでシオミズツボワムシの培養密度が200~300個体/mlにまで飛躍的に高まることを明らかにしたのである。パン酵母のみを用いて培養したワムシの魚類栄養学的欠陥とその解決法も明らかにされ、シオミズツボワムシの餌料として油脂酵母を用いることが急速に一般化した¹⁰⁻¹²⁾。

シオミズツボワムシのこの大量生産技術こそ今日までの種苗生産事業を支えてきたといっても過言ではない。

こうしてシオミズツボワムシの培養方法が確立されるとともに、度重なる仔稚魚の大量斃死を前にして、関係者が病原体、特に病原性細菌の運搬者としてまずシオミズツボワムシなどの餌料生物を疑ったのは皮肉な事実であった。このことに関する先駆的研究としては、煮沸後に冷却した海水や濾過滅菌海水等を用いてアルテミア *Artemia salina* (Brine shrimp:以下BSと記す) 幼生をふ化させれば、それら培養水に *Vibrio* が検出されないことを述べた武田らの報告¹³⁾ や、滅菌生理食塩水による単純な洗浄ではシオミズツボワムシの細菌数が減少しなかったが、ニトロフラン剤による薬浴では著しい *Vibrio* の減少が観察されたことを述べた林らの報告^{14, 15)} がある。特に後者のニトロフラン剤を用いる方法は一部の種苗生産機関で量産に実用化されるようになったが、生残率や安定性、成長や消化管内細菌叢等に及ぼす実際の影響についての科学的な検討は永く不十分なままであった。その後、著者らの研究により餌料生物における細菌汚染の軽減がある程度可能になっているが、最近ではより積極的に無害の細菌をワムシやBSに取り込ませ、それらを投与することにより仔魚における日和見病原菌による感染を防御するといった考え方も出されている¹⁶⁾。

本論文では、アンケート調査に基づいて種苗生産の安定性や平均生残率等に及ぼす餌料生物のニトロフラン剤の影響を検討するとともに¹⁷⁾、餌料生物の細菌汚染軽減方法について検討を行い¹⁸⁻²⁰⁾、また、それらの軽減方法を使用した場合の仔稚魚の成長や生残、消化管内細菌叢等についても検討を加えた^{21, 22)}。また、シオミズツボワムシ中における細菌の動態についても検討を実施して²³⁾、細菌群の役割について考察を加えた。近年多用される栄養強化処理の薬浴に与える影響についても章を改めて検討した²⁴⁾。

ところで長い間、シオミズツボワムシにはL型とS型の2タイプがあるとされていたが、近年になってワムシ類の分類は再編され²⁵⁾、現在本邦でもシオミズツボワムシなる和名はほぼ使われなくなっている。また、L型とS型は別種とされるようになり、L型ワムシの学名は

B. plicatilis, S型やSS型ワムシ(タイ国原産)のそれは *B. rotundiformis* とするのが一般的になってきたので、以下の本論文では、「ワムシ」とだけ記載し、型を併記する。

第I章

アユの人工種苗生産における 餌料と大量斃死に関するアンケート調査

昭和50年代、餌料生物の培養技術の進歩や、配合飼料の質的改善、および管理技術の向上等により、魚介類の種苗生産は、その種類および数量において飛躍的な発展を遂げた。アユの種苗生産もその例外ではなく、Fig.1-1に示したように、昭和53年度に約2,300万尾であったその生産数は年毎に急速に増加し、わずか6年間で3倍近い6,000万尾に達している。しかし、急速な拡大が一段落して安定化の気配がうかがわれるようになってくると、かつては飼育管理技術の未熟さで片づけられていた種苗生産期の大量斃死が魚病学的立場から注目されるようになった。

著者は当時、アユ人工生産種苗の初期斃死に関する研究の一環として、アユ種苗生産機関に対するアンケート調査を実施し、餌料生物の投与前処理と初期斃死との関係について調査したので、以下にその結果を述べる。

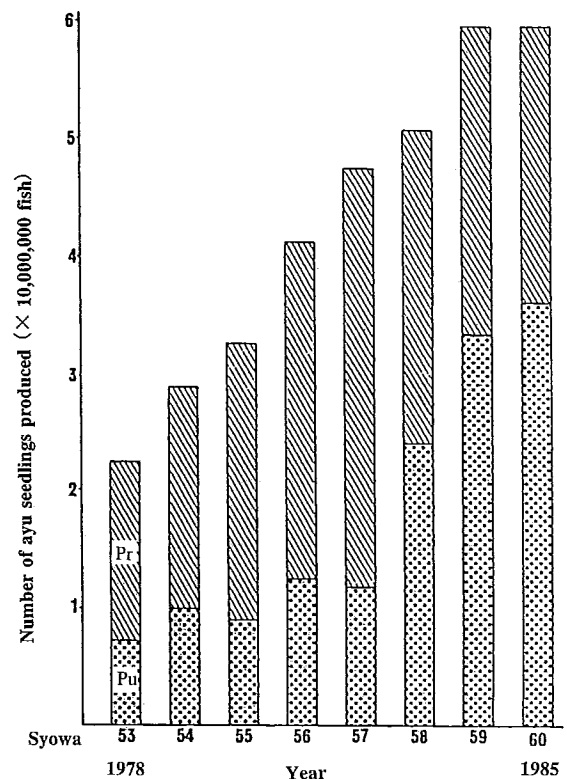


Fig.1-1. Changes in annual production of ayu (*Plecoglossus altivelis*) seedlings in public and private hatcheries. Pu:public, Pr:private.

アンケートの内容をFig.1-2に示した。本調査の設問は魚病学的立場から実施されたもので、飼育密度や給餌量、水温等の飼育管理技術に特に着目したのではない。

また、アンケート調査の依頼先は全国に当時あった40のアユ種苗生産機関すべてとし、これに岡山県水産試験場栽培漁業センター（以下当センターと記す）を加えた計41生産機関を調査対象とした。調査用紙の送付を昭和62年5月に行い、昭和59～61年度の3か年について記入を依頼した。

41生産機関の内訳は、県水産試験場、栽培漁業協会、あるいは公社といった県立または県立に準ずるものが27機関と最も多く、これを「公立」としてとりまとめた。また、漁業協同組合やその連合会、あるいは市立、または民間業者の運営による14の生産機関を「民営」として整理した。全国湖沼河川養殖研究会アユ種苗生産研究部会（現在のアユ初期飼料研究部会の前身）でも同じ分け方をしており、先に示したFig. 1-1の内訳もこれに従っている。

回答があったのは、公立27生産機関中23機関（85.2%）、民間14生産機関中12機関（85.7%）であり、

平均85%という高い回答率であった。ただ、生産機関によっては、生産を実施しなかった年度があったり、回答の記入のない項目があったりしたので、問いによっては必ずしも上記の合計の35機関とはなっていない。

1. 飼料系列について

設問1～3に対する回答結果を整理してFig.1-3およびTable 1-1～1-4に示した。

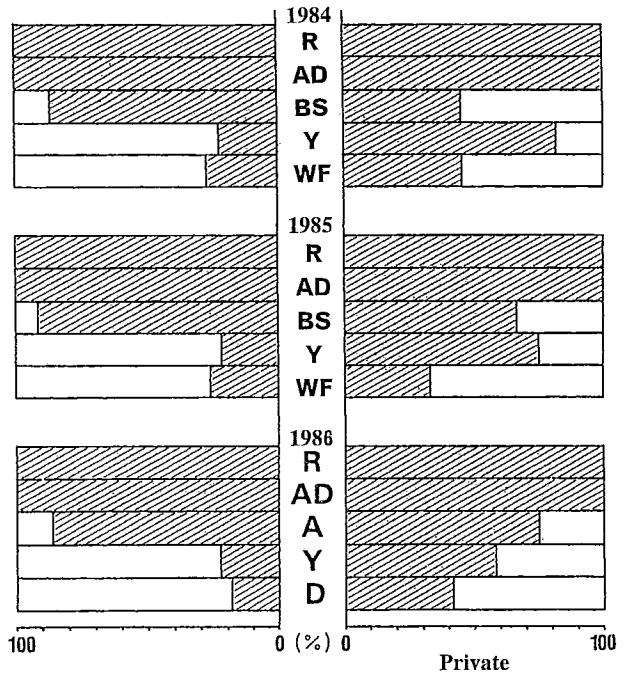


Fig.1-3. Kinds of diets used in public and private ayu hatcheries in 1984 (Showa 59)~1986 (Showa 61).
R:rotifer (*Brachionus* spp.), AD:artificial diet, BS:brine shrimp (*Artemia salina*), Y:yolk of chicken egg, WF:water flea

昭和 年度のアユ量産

1. 基本的飼料系列は？

1) ワムシ：ふ化後 () 日目から () 日目まで
 2) アルテミア：ふ化後 () 日目から () 日目まで
 3) 配合飼料：ふ化後 () 日目から () 日目まで
 4) その他、ミジンコや卵黄を使用していれば ()

2. 生産中に投与したワムシについて

1) 培養法は (バッチ式、間引き式) 2) 培養水温は () °C
 3) 型は (S型、L型)
 4) ワムシを投与する場合、病害防除の観点から、2次培養や薬浴等の処置を
 しましたか？ (はい、いいえ)
 「はい」の場合は、例を参考にして、方法を記入して下さい。

例) 海産クロレラ中で、エルバージュ20 ppm とともに6時間。

3. 生産中に投与したアルテミアについて

病害防除の観点から、ふ化方法に何等かの工夫をしましたか？ (はい、いいえ)
 「はい」の場合は、例を参考にして、方法を記入して下さい。

例) 24時間後に1度収穫して洗い、再度エルバージュ20 ppm と
 ともに24時間、28°C

4. 大量死がありましたか？ (はい、いいえ)
 「はい」の場合は、例を参考にして状況を記入して下さい。

日齢	体重	体長	水温	飼育水	投与していた飼料	被害
10	3mg	8mm	18	海水で循環	ワムシと配合	80%
検鏡結果	細菌検査結果	措置	効果	原因と根拠		
鱗の増生	実施せず	パラザン	なし	不明		

Fig.1-2. Questionnaire on the mortality of ayu seedlings in hatcheries.

Table 1-1. Combination of diets used in public and private ayu hatcheries from 1984 to 1986

Diet	Fiscal 1984 (S59)		Fiscal 1985 (S60)		Fiscal 1986 (S61)	
	Public (22) ^{*1}	Private (11)	Public (23)	Private (12)	Public (22)	Private (12)
R · AD	1 ^{*2}	0	1	1	1	0
R · AD · BS	11	1	12	1	12	3
R · AD · Y	0	3	0	1	0	1
R · AD · WF	2	0	1	0	2	0
R · AD · BS · Y · WF	1	1	1	3	0	1
R · AD · BS · Y	4	2	4	3	5	3
R · AD · BS · WF	3	1	4	1	2	2
R · AD · Y · WF	0	3	0	2	0	2

R : rotifer, AD:artificial diet, BS : brine shrimp, Y : chicken egg yolk, WF : water flea.

*1 Number of hatcheries surveyed.

*2 Number of hatcheries where the given diets was fed.

Table 1-2. Days after hatching when each diet was administered for mass-production of ayu seedlings in hatcheries

		R		AD		BS		Y		WF	
		Beginning	Termination	Beginning	Termination	Beginning	Termination	Beginning	Termination	Beginning	Termination
Fiscal 1984	Public	1.2 (0-5)	68.7 (5-110)	11.7 (0-45)	29.5 (10-56)	102.5 (70-164)	19.0 (5-30)	85.0 (75-100)	61.0 (45-101)	102.2 (75-150)	
	(S59) Private	1.6 (0-3)	92.1 (59-120)	6.8 (1-12)	36.2 (20-63)	92.2 (70-114)	12.0 (3-20)	54.6 (20-94)	68.0 (50-110)	122.0 (110-130)	
Fiscal 1985	Public	1.3 (0-5)	65.7 (25-90)	11.7 (1-26)	32.8 (10-56)	105.9 (57-160)	20.0 (5-30)	72.8 (30-90)	53.8 (41-64)	87.8 (74-107)	
	(S60) Private	1.7 (0-3)	78.0 (40-116)	7.3 (1-15)	41.1 (15-69)	89.6 (50-112)	11.4 (1-20)	54.7 (20-100)	71.7 (45-110)	122.5 (115-130)	
Fiscal 1986	Public	1.3 (0-5)	68.0 (30-110)	13.2 (1-60)	29.5 (10-61)	92.8 (60-120)	23.4 (20-30)	67.0 (30-90)	64.0 (41-90)	91.7 (70-105)	
	(S61) Private	1.5 (0-3)	74.6 (30-130)	9.3 (1-30)	38.8 (15-70)	89.3 (60-120)	15.0 (5-33)	59.9 (38-100)	52.0 (45-70)	113.0 (75-130)	

R : rotifer, AD : artificial diet, BS : brine shrimp, Y : chicken egg yolk, WF : water flea, () : range

Table 1-3. Method for culture in ayu hatcheries

	Fiscal 1984 (S59)		Fiscal 1985 (S60)		Fiscal 1986 (S61)	
	Public	Private	Public	Private	Public	Private
	Type of rotifer : S type	15*	6	16	6	18
	L type	2	0	2	1	2
	Both	5	1	5	4	2
Culture method : Batch method	16	7	15	7	16	7
	Thinning method	5	2	7	2	6
	Mixed	1	1	0	2	0
Disinfection of rotifer	2	1	3	3	3	3

*Number of hatcheries where given diet or method was used.

Batch method : A whole batch of rotifers cultured in a tank is collectively harvested when the density of the animals is highest.

Thinning method : Some amounts of rotifers cultured in a tank are intermittently harvested by keeping continuous culture.

Table 1-4. Usage and disinfection of brine shrimp (*Artemia salina*) in ayu hatcheries

	Fiscal 1984 (S59)		Fiscal 1985 (S60)		Fiscal 1986 (S61)	
	Public (22)*	Private (6)	Public (26)	Private (11)	Public (23)	Private (15)
	Number of hatcheries using <i>Artemia</i>	19	5	21	8	19
Disinfection before use	3	1	5	3	4	6

* Number of ayu hatcheries surveyed

まず、Fig.1-3に示したように、公立あるいは民間を問わず、3年度ともすべての生産機関において、アユの飼餌料としてワムシおよび配合飼料が共通して投与されていた。

一方、BS幼生は多くの公立の機関で(年度別に19/22, 21/23, 19/22)投与されていたが、民間では比較的少なく昭和59年度45.5% (5/11)の生産機関で使用されたに過ぎなかった。ただ、その後この割合

は増加し、昭和61年度には75.0% (9/12)と用いた機関が増えている。

また公立のうち、鶏卵黄やミジンコ(種不明)を投与した機関の割合はともに20%前後と低かったが、民間では高く、特に鶏卵黄は半数以上の機関で投与されていた。

次に、餌料の組み合わせ別にそれを採用した生産機関数をTable 1-1に示した。例えば昭和61年度、公立の22

機関のうち半数以上の12機関は、ワムシ、配合飼料、およびBSの3種類の餌料のみを用いてアユ種苗生産を実施していた。また、この3種類に加えて鶏卵黄を用いた機関が次いで多く5機関を数えた。これらの割合には年度による変化が少なかった。

一方、民間では、昭和61年度に、ワムシ、配合飼料、およびBSの3種を投与した機関、さらにこれら3種類のほかに鶏卵黄を投与した機関を加えても、12機関中6機関でしかなかった。総じて、民間よりも公立の機関で、比較的単純な餌料系列がとられていると判断された。

次に、各餌料のアユ仔魚に対する投与開始日齢と終了日齢をTable 1-2に示した。それによると、例えば昭和61年度、ワムシの平均投与開始日齢は、公立で1.3日、民間で1.5日とほとんど差はなかったが、平均74.6日まで続けた民間機関に比べ、公立の機関では投与期間がやや短く、平均68.0日齢で終了していた。配合飼料の場合は、平均9.3日齢で投与を開始する民間機関に比べて、公立では平均13.2日齢からやや遅くなっている。同様に、BSについて比較すると、公立期間においては民間のそれよりも、早くから遅くまで、比較的長期間にわたって投与が行われていた。鶏卵黄については、公立よりも民間のほうが、より早くから投与しているが、終了するのも早かった。ミジンコの場合はBSと逆に、公立よりも民間で早くから与え、終了も遅かった。比較的高価なBSの代替の考え方に基づいているものと思われる。上述の傾向は昭和61年度だけでなく、他年度においても同様に認められた。

以上のように、アユ仔魚に投与する餌料の種類と、その投与期間については各生産機関による差が大きく、一様ではなかった。これは、飼育水温や飼育密度等の違いを考慮に入れても依然として著しい差があると判断され、従来からの経験的な判断が優先しがちな種苗生産現場の現状を示しているように思われた。

また、各生産機関の餌料系列においては、餌料の種類が比較的多いだけでなく、その投与期間が必要以上に長期間に及んでいることがわかった。著者が量産規模で検討したところ、アユ仔魚に対するワムシの投与は33日齢前後、平均体重約12mgまででほぼ十分であるという結果を得ている（未発表）。仮に、ワムシやBS等の餌料生物が多量に保有する細菌等が大量斃死に何等かの形

で関与しているとすれば^{13, 14, 26, 27}、この長期間の投与は、大量斃死発生の危険をむしろ増すことになるかと推察された。

次に、使用されたワムシの型、培養方法、薬浴処理の有無についてのアンケートの結果をTable 1-3に示した。それによると、3年度ともいわゆるS型ワムシを間引き方式で培養して、アユ仔魚に投与した機関がもっとも多かった。また、ワムシに対して薬浴処理を実施したのは公民合わせても33機関中6機関（18.2%、昭和61年度）であった。

一方、BSの場合は、Table 1-4に示したように、ワムシの場合よりも比較的多くの機関において薬浴処理が行われていた。すなわち、昭和61年度には、公立19機関中4機関（21.1%）、また民間では9機関中6機関（66.7%）で薬浴処理が実施されていた。

なお、ワムシおよびBSのいずれの場合も、使用された薬剤のほとんどはニフルスチレン酸ナトリウム（以下NFS）であったが、オキシリン酸も1例（昭和59年度、ワムシ）みられた。

2. 大量斃死について

種苗生産中の仔稚魚における大量斃死については各県水産試験場や栽培漁業センターの報告書にもしばしば記載がみられる。しかし、タイ類やヒラメ*Paralichthys olivaceus*等と比べて、アユにおける特徴は時に極めて急激な減耗が起きることにあると思われる。事実、極端な例では、一部の仔魚に異常な遊泳が始まり、わずか2時間で全滅にいたったという報告例がある^{*1}。また、当センターでも、前日退庁時には何ら異常を認めなかった30日齢前後のアユ仔魚が、翌日登庁時には複数の飼育水槽でほぼ全滅していた事例^{*2, *3}をかつて経験しており、このような場合は対策を講じる時間的余裕がないのが現状である。しかし、一方では、比較的緩やかな異常斃死が10日間以上続く例もあって、それらすべての斃死原因を同一の原因と考えるには無理があるようにも思われる。

海産魚介類については、日本栽培漁業協会の種苗期疾病情報事業により情報が比較的活発に交換されているが²⁸、アユ仔魚の大量斃死について魚病学的に検討された例は極めて少なく、*Vibrio anguillarum*感染症に

*1 玉森英男・小川舜二・高橋剛叟（1984）：アユ種苗生産。昭和57年度愛知県栽培漁業協会業務報告書、16-24。

*2 難波洋平・山野井英夫（1981）：アユの種苗生産。昭和55年度岡山県水産試験場業務報告書、205-212。

*3 難波洋平・山野井英夫・杉山瑛之（1985）：アユの種苗生産。昭和59年度岡山県水産試験場業務報告書、221-222。

Table 1-5. Occurrences of mass mortality of ayu seedlings in hatcheries from 1984 to 1986

	Hatchery	Number of ayu hatcheries that experienced Mass mortality / hatcheries surveyed (%)	
in fiscal 1984 (S59)	public	10/22 (45.5)	(47.1)
	private	6/12 (50.0)	
in fiscal 1985 (S60)	public	13/23 (56.5)	(51.4)
	private	5/12 (41.7)	
in fiscal 1986 (S61)	public	9/22 (40.9)	(41.2)
	private	5/12 (41.7)	
Hatcheries with mass mortality in all the 3 years	public	4/22 (18.2)	(23.5)
	private	4/12 (33.3)	
Hatcheries with no mass mortality in any of the 3 years	public	4/22 (18.2)	(20.5)
	private	3/12 (25.0)	

Table 1-6. Effects of disinfection of live diets (rotifer and brine shrimp) on the occurrence of mass mortality

Occurrence of mass mortality	Implementation of disinfection	
	Yes	No
Yes	3*(21.9%)	35 (46.1%)
No	9 (78.1%)	41 (53.9%)

* total number of hatcheries cumulated in three fiscal years(1984 ~ 1986)

よるとした例²⁶⁾があるに過ぎない。そこで、この状況を踏まえ調査にあたっては、大量斃死を特に定義付けたりせず、底掃除設備の有無や管理技術の巧拙に大きな差があらうと思われはしたものの、あえて回答者の主観にゆだねることで可能な限りの事例を集めるようにした。そのため、事故とすべき例が含まれたことや、被害程度に3~100%と大きな開きがあったことなどやや不統一な点もみられたが、斃死原因の推定も含めて回答者に一任した。

大量斃死発生の有無と餌料の薬浴の有無 大量斃死発生の有無についての結果をTable 1-5に示した。年度により若干の差はあるが、41~51%の機関で大量斃死を経験しており、また調査した3年度にわたって、一度も

大量斃死のなかった機関も7機関(21%)あったが、一方で何らかの大量斃死を毎年経験した機関も8機関(24%)あった。

また、餌料生物、特にワムシとBSに対する薬浴処理は、大量斃死発生の予防対策として考えた場合興味深いものがある。そこで、薬浴を実施した機関と、まったく実施しなかった機関のそれぞれにおける大量斃死の有無を、3年間を延べにしてTable 1-6に示した。なお、ワムシとBSの双方を投与し、かついずれか一方にのみ薬浴を実施した例(ワムシにのみ:延べ1機関、BSにのみ:延べ8機関)は比較的少なかったため、表からは省いた。また、鶏卵黄は加熱加工を経ていること、ミジンコは淡水産であるため、*V. anguillarum*感染症の感染源とは考えにくいことから、特には検討しなかった。結果をみると、上記の餌料生物に対して(BSを投与しなかった機関にあってはワムシにのみ)薬浴処理を実施しなかった延べ76機関のうち46%にあたる延べ35機関で大量斃死が発生していた。しかし、ワムシとBSの双方に薬浴を実施した場合は、延べ14機関のうち大量斃死を経験した機関は延べ3機関(22%)にとどまり、明瞭な差が認められた。このことは、ある種の大量斃死の場合、使用された薬剤に感受性を有する細菌が何等かの形でこれに関与し、かつ餌料生物が感染源の1つとして

重要な位置を占めていることを示唆するようにも思われた。ただ、先に触れた大量斃死経験のない8機関と、毎年経験した7機関とについて、薬浴の有無について比較

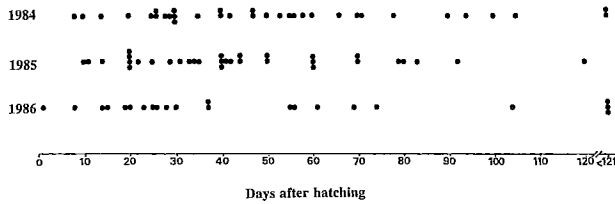


Fig.1-4. Days after hatching when mass mortalities of ayu seedlings occurred in hatcheries (1984-1986). Each dot represents one occurrence of mass mortality.

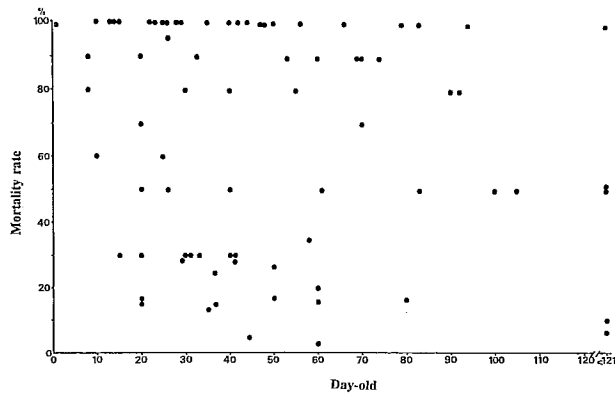


Fig.1-5. Mortality rate and age (day-old) of ayu seedlings recorded in hatcheries (1984-1986).

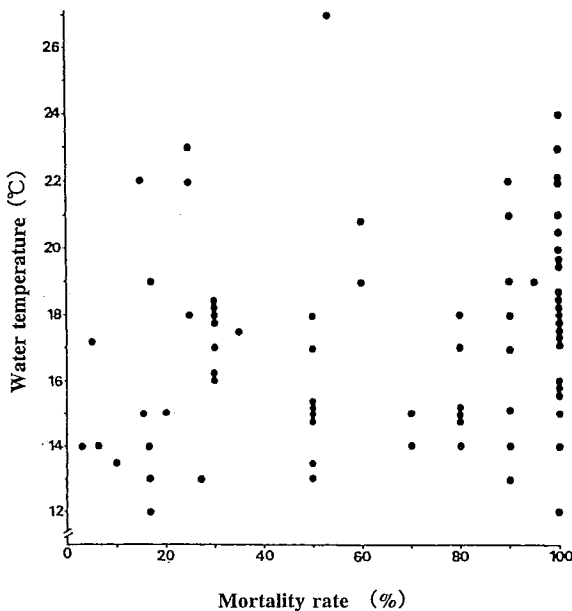


Fig.1-6. Mortality rate of ayu seedlings and water temperature of ponds where each mortality was recorded in hatcheries (1984-1986).

してみると、ともにそれぞれに2機関が薬浴を実施していたに過ぎなかった。

大量斃死と各種要因との関係 次に、回答のあった大量斃死例合計89件の発生時の日齢を年度ごとにFig.1-4に示した。本図にみられるように、事故かと思われる3例をも含め大量斃死の発生した日齢が広く分布し、特に偏りがなかったことがわかった。

また、大量斃死発生時の日齢と被害の程度との関係をFig.1-5に示した。図から明らかなように、飼育初期ほど被害が大きかったといった明瞭な傾向はみられず、日齢と被害程度に特別な関連はなかった。

次に、水温と被害の程度との関係をFig.1-6に示したが、そこにも特に顕著な傾向は伺えず、比較的広い水温にわたって大量斃死が発生していることがわかった。

一方、用水管理の失敗など明らかな管理上の原因による大量斃死3件を除く86件の大量斃死例を、斃死発生時に投与されていた餌料に着目して整理しTable 1-7に示した。この場合、先にTable 1-6に示した分け方と同様、ワムシとBSの投与の有無に着目して整理を行った。それによると、86件の大量斃死例のうち配合飼料のみが投与されていた例はわずか7件しかなかった。残る79件の内訳は、ワムシ38件、BS 10件、ワムシ及びBSが31件であった。これは、餌料生物の投与期間が非

Table 1-7. Relationship between the occurrence of mass mortality and diets in ayu seedlings (1984~1986)

Combination of diets	Number of occurrence of mortality
R	3
R · AD · Y	9
R · AD · WF	1
R · AD	25
BS · AD · Y	3
BS · AD	7
R · BS · AD	26
R · BS · AD · WF	2
R · BS · AD · Y	2
R · BS	1
AD	7
Total	86

R : rotifer, AD : artificial diet, BS : brine shrimp, Y : chicken egg yolk, WF : water flea

常に長期にわたり、飼育機関の過半を占めるがゆえに、結果として大量斃死発生と重なっただけとも考えられる。しかし、ワムシおよびBSに薬浴を実施することで大量斃死発生率が低下していたことも合わせ考慮すると、単なる偶然とも考えられなかった。

次に、上述の89件の斃死例について内訳をみたところ、Fig.1-7に示したように分けることができた。原因が一応推定されたものは全体の30.3% (27件) に過ぎなかったが、そのうち事故または管理上の失敗とされた例が14件を占めた。しかし、この14件中には、大量斃死の誘因となることはあっても直接的原因とは考えにくい過密飼育や、他の生産機関では特に問題のない水温下での飼育を高水温飼育として、それぞれ大量斃死の原因とした11件が含まれ、同列に論じることはできなかった。

また、何等かの細菌学的検討をしたうえでいわゆるピブリオ病と診断されたものが6件あった。このうちもっとも早い発生例はふ化後20日齢と、従来の知見(14日齢)と比較的近いものではあったが、詳しい検討方法や分離菌株の性状は不明である。その他、3件のウージニウム症による大量斃死、および魚病の範疇とするには異論もあるかもしれないが、飼育水中に発生した粘液物質による大量斃死が3件あった。また、92日齢のアユ仔魚において *Aeromonas* sp. に起因した斃死が発生し、

80%の被害を受けた例が1件あったものの、淡水馴致の後であったかどうかは不明である。

原因不明の大量斃死 次に、アンケート回答者が原因不明とした62件の大量斃死について内容を述べる。

魚病学的検討がまったく実施されなかった例がもっとも多く25件を数えたが、検鏡観察および原因菌の分離のいずれか、あるいは双方が試みられた例は38件にのぼった。

検鏡観察のみ実施された15件の大量斃死についてその観察結果をみると、何等異常が認められなかったものが7件あった。しかし、残る8件では、腹部あるいは腸管の白濁が特徴として述べられていた。一方、細菌学的検査(原因菌の分離)のみ試みられた7件についてみると、まったく細菌が分離されなかった例が6件と多く、残る1件では細菌が分離されたが既知の魚病細菌ではなかった。

また、検鏡観察および細菌学的検査がともに実施された15件の斃死例についての検査結果をみると、腹部、腸管、あるいは体表の白濁が確認されている例がもっとも多く6件あった。6件ともある種の *Vibrio* が分離されていたが、いずれも既知の魚病細菌ではなかったとされている。

次いで多いのは、外観上は異常なしとされた例で4件あった。いずれも細菌が分離されていたが、先と同様に

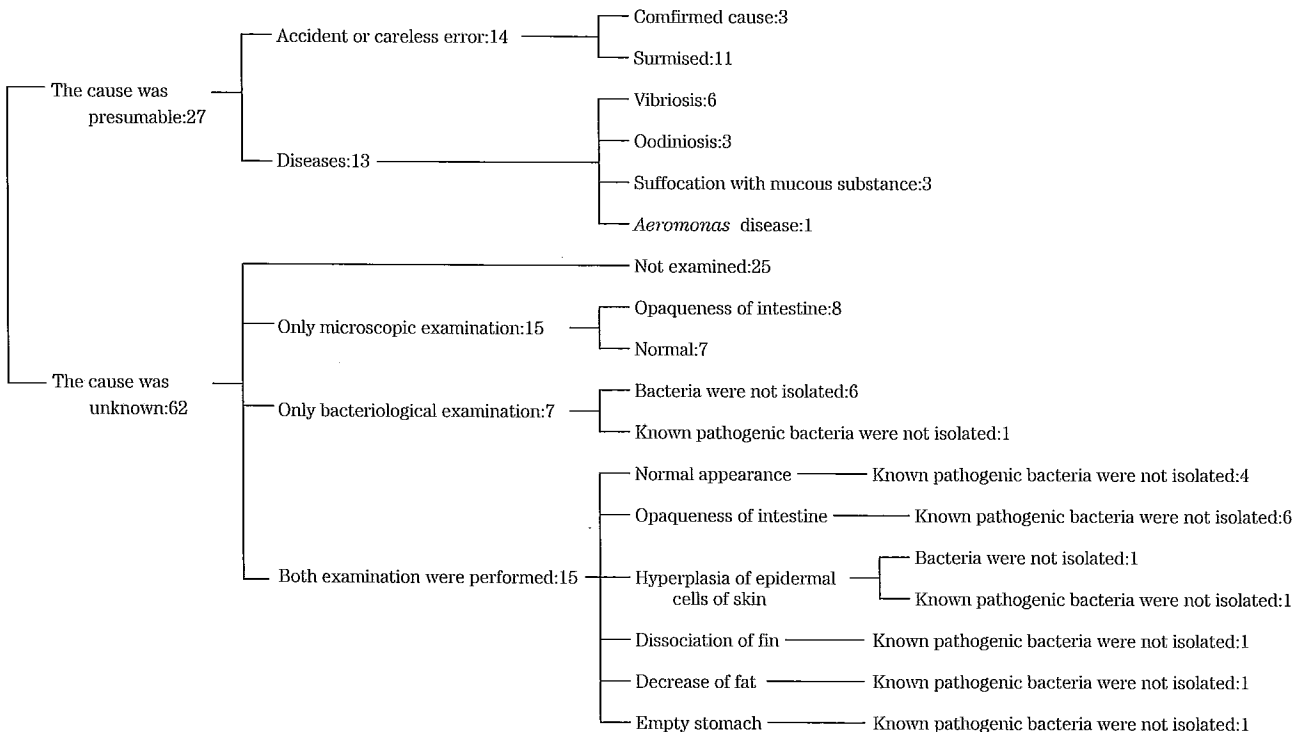


Fig.1-7. The reported causes of mass-mortalities among ayu seedlings in hatcheries (1984-1986).

既知の魚病細菌ではなかった。また、鱗あるいは体表の細胞の増生が認められた2件のうち1件は、通常分離方法で細菌は陰性であった。魚体全体を磨碎して検体とした残る1例では、分離菌はやはり既知の魚病細菌ではなかった。

そのほか、鱗の融解や空胃等を外観的特徴とした3件の事例においても、細菌の分離はされたが、既知の魚病細菌ではなかった。

以上述べたように、細菌がまったく分離されないか、分離されても既知の魚病細菌ではない事例が極めて多く、少なくとも *V. anguillarum* によるビプリオ病が仔稚魚期に多発しているといった傾向は認められなかった。またこのことから、細菌だけではなく、例えばウイルス等の関与も疑われる結果となった。回答例のうち数件についてはウイルスチェックも実施されていたが、結論は得られていない。

しかし、仔稚魚の消化管内生理、特に細菌叢に関する知見が乏しく、また従来の原因菌分離方法が菌血症あるいは敗血症を前提の1つとしていること等を考えると、このような仔稚魚の大量斃死の診断については新たな方法論の検討とその応用²⁹⁾が必要と思われた。

3. 近年の状況について

全国湖沼河川養殖研究会のアユ初期飼料研究部会が平成7年度の生産方法について、生産マニュアル作成を目的としたアンケート調査を実施している。そこでは、アユ種苗生産を行っている全国52機関中21機関から回答を得ているので、上述の著者の調査と関連した事項について一部紹介する。

「すべての機関で、ワムシ、アルテミア幼生、配合飼料を使用しているのは共通しており、またこれ以外の餌料を使用している機関はほとんどない。給餌開始時からワムシを与えることは回答した全機関に共通しているが、ワムシ投与終了の時期は、やや巾があり、30～50日目までが中心となっている。」

「アルテミア幼生の投与終了時期は40～120日目と大きな巾があるが、50～80日目までに、それぞれ終了している例が比較的多い。」

「アルテミア幼生も含めて、培養時に細菌数の低減を目的とした薬剤処理を行っている機関が約半数(10/21)あり、使用している薬剤はニフルスチレン酸ナトリウム製剤(9/10)が中心である。」

これらの記述に基づいて集計された資料から算出したところ、餌料生物の投与終了時のアユの日齢はワムシの

場合で平均46日齢、BSの場合で69日齢であり、著者による既述の結果と比べて20～25日ほども早くなっていた。また、ワムシ、BS、配合飼料の3種以外の餌料を使用したのはわずか1機関で、餌料系列は明らかにかつてより大幅に単純化されている。著者が指摘した餌料生物の長過ぎる投与期間と不必要な多種類給餌は相当程度是正されたようである。

また、餌料生物に薬浴処理を行っている機関は、昭和61年度に20%もなかったことを考慮すると、薬浴の重要性に関する認識が広まったと解釈できる。

しかし、過去の資料が失われていたりして、もっとも興味深い異常斃死発生率や生残率の変遷に関する状況は残念ながら実ははっきりしなかった。ただ、薬浴の有無についてアンケートに回答し、かつ生産状況について行われた同部会の別の調査にも共通して回答している機関を、それらの資料から抜粋して、薬浴の有無と生残率との関係について独自に比較したところ、餌料生物に薬浴を一切しなかった8機関の平成7年度の平均生残率が16%であったのに対して、薬浴を励行した別の8機関の平均生残率は平均36%と倍以上も優れていた(全機関の生産尾数を全機関の収容ふ化仔魚数の合計で除した平均生残率は24%)。

アユ初期飼料研究部会のとりまとめ資料によると、公営、公益法人および民間合わせて全国で31の種苗生産機関が平成8年度に8,488万尾、同9年度には8,062万尾のアユ種苗を生産したとされている。しかし、同部会のとりまとめはアユ種苗生産機関のすべてを把握したものではなく、調査依頼に回答のあった機関に限られていること、昭和60年代初頭に41の生産機関で約6,000万尾であったことを考えると、現在ある52生産機関におけるアユ種苗生産数の合計は1億尾以上に達していると推測される。

冷水病等の問題^{30,31)}から琵琶湖産アユ種苗の健苗性に関する評価が低下している近年の状況から、人工アユ種苗の評価と需要は相対的に高まっている。異常斃死を少なくして種苗の生産効率を向上させ、健苗性を高めることは今後とも極めて重要なことと考えられた。

第二章

細菌汚染軽減の試み

1. ワムシの保有細菌数に及ぼすNFS薬浴と紫外線照射の影響

アユあるいは海産魚の種苗生産過程に発生する細菌感染症の感染源として、餌料としてのワムシが保有する細菌

菌群が早くから疑われていた^{14, 26, 27)}。そのため、種苗生産現場においては投与前のワムシに対するNFS浴^{*1*2*3)}、あるいは紫外線照射を仔魚期の病害予防対策としている例^{*4)}が一部でみられていたが、これらの処理方法によりどの程度細菌数が減少するのかその検討例は当時ごく少なかった¹⁵⁾。

そこで、それらの処理方法がワムシの保有する細菌数に及ぼす影響を検討したので以下に結果を述べる。

材料および方法

ワムシ細菌数に及ぼすNFS浴の影響 当センターで大量培養しているワムシ (S型) を材料とした。ワムシに対するNFS浴の濃度や薬浴時間は生産機関により差があり一様ではない。NFSの水への溶解度は3.86mg/ml (10℃) と比較的高い³²⁾ が、薬剤使用基準からみてワムシのNFS浴といった使用方法が必ずしも推奨されないこと、加えて薬浴時に用いられる水槽の規模が数百から数千lと大きく、経済性および廃水処理の問題が無視できないと考えられた。また、現在種苗生産機関でワムシの薬浴に用いられている薬剤が事実上NFSのみであること、他に適当な薬剤が見当たらないことから、耐性菌の出現と増殖を避けるためには長時間浴よりも短時間浴が望ましいとも推察された。

そこで、以下の試験区を設けて、NFSの低濃度、短時間浴がワムシ細菌数に及ぼす影響を検討した。

- 1) 対照区：海水のみ。
- 2) ナンノ区：海水に *Nannochloropsis oculata* を約 1.5×10^7 細胞/ml となるよう加えた。
- 3) 薬浴区：ナンノ区に、1 mg/l の濃度になるよう NFS を添加した。

上述の3つの試水に、密度が約5,000個体/mlになるようそれぞれワムシを接種して、0、2および4時間後に、以下に示す方法によってワムシ1g当たりの細菌数を測定した。なお、実験中の水温は25.1℃であった。

目合い42μmのプランクトンネットにワムシ浮遊液を移して海水で洗浄後、ネットの裏側から余分な水分を除いた。次に、ガラスホモジナイザーにその一部 (0.1~0.2g) をとって秤量後、滅菌海水とともに磨砕した。これを原液として、希釈水には滅菌海水を用い、平板培

養法によってその細菌 (生菌) 数を測定した。培地として、ZoBell's 2216e 寒天培地³³⁾ およびB T B ティポール寒天培地 (日水) を用い、便宜上前者に増殖した細菌を一般細菌、後者におけるそれをB T B 細菌とした。25℃で2日間培養したのちそれぞれの集落数を計数した²⁹⁾。

なお、本論文中における細菌検査等の手法は、特に記述しない限りすべて本法に基本的に準拠した。

ワムシ細菌数に及ぼす紫外線の影響 *N. oculata* を加えた海水 ($2.0 \sim 3.0 \times 10^7$ 細胞/ml) を用いて以下の試験区を設けた (Fig.2-1)。

I区：500l水槽にワムシを収容し、マグネットポンプと紫外線による水殺菌装置 (USP-2, 牛尾電機) を接続し、約23℃の水温下で循環した。試験開始時のワムシ密度は約1,000個体/ml、回転率は約50回転/日であった。

II区：I区の対照区として、海産クロレラのみを供試した。水温は約23℃であった。

III区：密度が約500個体/mlとなるようワムシを添加し、紫外線殺菌灯 (20W) を水中に懸垂した (USP-2を改造)。水温は約23℃であった。

IV区：約500個体/mlとなるようワムシを添加し、42μmのプランクトンネットを使用して、その

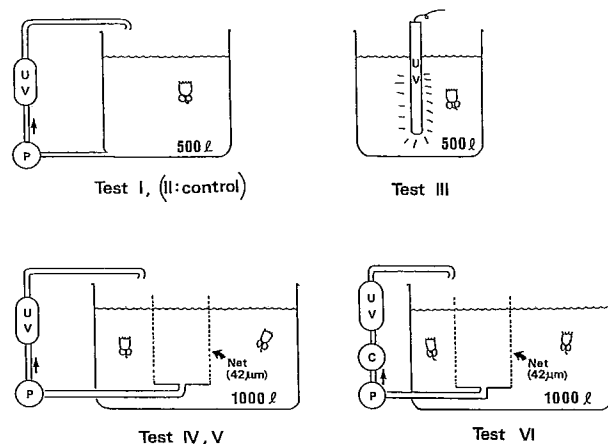


Fig.2-1. The experimental installation used for reduction of bacterial contamination in rotifers. P:Pump, UV:Ultraviolet irradiation apparatus, C:Chiller.

*1 尾田 正・萱野泰久 (1986) : ヒラメの種苗生産. 岡山県水産試験場報告, 1, 176-181.

*2 田丸寿雄・脇野 孝・岡本五十鈴・中岡富枝 (1986) : アユ種苗生産. 昭和59年度広島市水産振興協会業務報告書, 19-26.

*3 那須 司・田原 健 (1987) : アユ種苗生産. 昭和60年度宮崎県栽培漁業センター業務・研究報告書, 31-42.

*4 小山茂生・土屋文人・山田和雄・吉田照喜知・渡辺 昭 (1982) : アユ種苗生産. 昭和55年度新潟県栽培漁業センター業務・研究報告書, 5, 57-62.

培養水のみを循環しながら紫外線殺菌した。水温は約25℃、回転率は約30回転/日であった。また、IV～VIでは紫外線殺菌装置としてユーゾン110MR（セン特殊光源）を用いた。

V区：IV区と同条件で、NFSを約2.5mg/lの濃度に添加した。

VI区：in vitroの試験結果から、ワムシ由来分離菌株のいずれもが10℃では増殖しなかったこと、ワムシは5℃程度の水温下でも数日間は死亡せず活発に遊泳することから、IV区の装置にさらに冷水機を接続した。ワムシ密度は約1,000個体/ml、水温は約10℃、回転率は約30回転/日であった。照射開始24時間後に、既述の方法に従ってワムシの細菌数を測定し、照射前と比較した。

結果および考察

ワムシ細菌数に及ぼすNFSの影響 それぞれの試験区におけるワムシ細菌数の変化をFig.2-2に示した。対照区およびナノ区では、ワムシの一般細菌数および

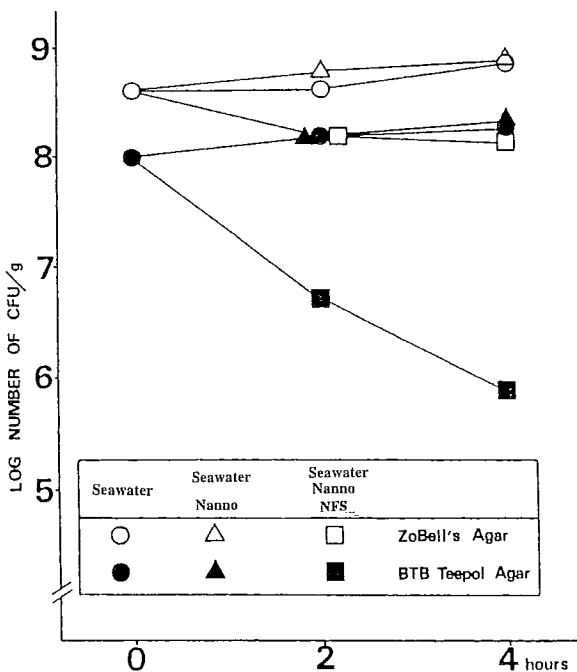


Fig.2-2. Effects of sodium nifurstyrenate bath on the elimination of bacteria associated with rotifer. NFS:sodium nifurstyrenate, Nanno: *Nannochloropsis oculata*

*Vibrio*属細菌数を表すと考えられるB T B細菌数ともにほとんど変化はなかった。*N. oculata*には*Salmonella typhimurium*に対する比較的強い殺菌作用があるとの報告^{*1}もあるが、少なくとも本実験系においては、*N. oculata*にワムシ細菌数を減少させるような効果はなかった。

一方、NFSを使用した薬浴区における細菌数の変化をみると、 1.6×10^8 CFU/gであったB T B細菌数は4時間後には 8.1×10^5 CFU/gまで3桁も減少し、一般細菌数も1/3程度減少していた。このことは、一般細菌の1/3程度を当初占めていたB T B細菌が著しく減少したことを表している。

しかし、別に数回の実験を実施したところ、一般細菌数はもちろんB T B細菌数にも何等変化が認められない測定結果がしばしば得られた。このことと、ワムシのNFS浴実施によって種苗生産成績が安定するとも一部でいわれていることを合わせ考慮すると、NFSに感受性を有し、かつ仔稚魚に有害な細菌が優占するような時のみNFSの薬浴効果が発揮されるものとも考えられる。

B T B細菌は*Vibrio*属細菌と読み替えることが事実上可能であるので、ワムシ中に時に優占するその*Vibrio*属細菌を十分に減少させれば、種苗生産成績を改善すると考えることができる。すなわち、*Vibrio*属細菌には高濃度に餌料中に存在した場合、仔稚魚に日和見感染症もしくは食中毒的な疾病を起こすものがあることが推察された。

Tanasomwang and Muroga^{34,35)}はワムシの細菌叢に及ぼすNFSの影響を調べて、NFS浴によるB T B細菌の著しい減少を報告するとともに、NFSの*Vibrio*に対する優れた選択的有効性について述べている。混在する一般細菌の主体を占める*Moraxella*や*Acinetobacter*に比べて*Vibrio*のNFSに対するMICが低いことに起因した現象であることを彼女らは明らかにしており、今回観察された現象を説明する結果となっている。

ワムシ細菌数に及ぼす紫外線の影響 I～VIの各試験区の結果を合わせてTable 2-1に示した。なお、実験開始時におけるワムシの細菌数には特に大きな差はなかったもので、表中では平均値でもって開始時細菌数とした。

表に示したように、*N. oculata*のみを紫外線で循環殺菌したII区においては、培養水1ml当たりの一般細菌数は2桁、B T B細菌数は3桁それぞれ減少していた。

*1 中山大樹・雨宮由美子・大野正夫(1982)：海水中での腸内細菌の消長に及ぼすプランクトン等の効果一Ⅲ，昭和57年度日本水産学会春季大会講演要旨集，118。

Table 2-1. Effects of ultraviolet irradiation on the elimination of bacteria associated with rotifer

Experimental group	Seawater (CFU/ml)		Rotifer (CFU/g)	
	ZoBell	BTB	ZoBell	BTB
Start	3.7×10^5	8.7×10^4	6.9×10^8	1.1×10^6
I	7.3×10^4	2.3×10^3	5.8×10^6	9.3×10^5
II (without rotifer)	3.7×10^3	4.0×10	—	—
III	NT	NT	1.9×10^7	4.6×10^6
IV	6.3×10^4	8.4×10^2	8.5×10^7	7.5×10^6
V	1.6×10^4	5.0	5.8×10^7	7.6×10^5
VI	NT	NT	2.3×10^8	7.2×10^7

ZoBell:ZoBell's 2216e agar, BTB:BTB teepol agar, NT:not tested
Experimental designs of each group (I-VI) are shown in Fig.2-1.

また、ワムシを供試した I 区では、培養水の細菌数は、ワムシから細菌が排出されたためか一般細菌および B T B 細菌ともに 1 桁の減少にとどまった。しかし、ワムシ 1 g 当たりの一般細菌数および B T B 細菌数には 2 ~ 3 桁の減少が観察された。検鏡したところ、この判定時に半数近いワムシが既に死亡しており、紫外線あるいはポンプ通過による影響と考えられた。

一方、紫外線殺菌灯を水中懸垂した III 区では、ワムシの一般細菌数および B T B 細菌数は 1 ~ 2 桁減少するにとどまった。しかも、70% 以上のワムシが死亡しており、紫外線に対するワムシの感受性は高いと思われた。

このように、ワムシに紫外線を直接照射する方法は、多少の効果を有してはいたものの、ワムシをも死亡させることから必ずしも実用的な処理方法とは思われなかった。したがって、本法はもちろん、投与前のワムシ浮遊液に液上から短時間の紫外線照射を行う方法にもさして効果は期待できないと考えられた。

また、プランクトンネットを用いて、ワムシの培養水のみを循環し、紫外線照射した IV 区では、培養水およびワムシの細菌数はいずれもわずか 1 ~ 2 桁減少したに過ぎなかった。

NFS を併用した V 区では、培養水およびワムシの B T B 細菌数は 3 あるいは 2 桁減少していたが、一般細菌数には 1 桁の減少が観察されたに過ぎなかった。この結果は先に述べた NFS 浴のみの結果とほとんど同じであった。

また、低水温のため培養槽内における細菌の増殖はないと考えられる VI 区においては、ワムシの一般細菌数、B T B 細菌数ともにほとんど変化はなかった。

IV 区および V 区では、紫外線の殺菌効果のほとんどを、培養槽内の細菌増殖が相殺していたとも考えられる。また VI 区では、低水温によるワムシの濾水率低下も推察さ

れた。しかし、いずれにしてもワムシとその保有細菌とのいわば親和性が極めて高いことを示唆する結果となった。

I ~ VI 区の結果を総合して考えると、紫外線をワムシに直接照射すれば、ワムシの細菌数をある程度減少させるものの、ワムシそのものをも弱らせる結果となり実用上問題があった。また培養水のみを循環して紫外線処理する間接照射の場合はその効果は低く、あまり著効は期待できないことがわかった。

最近、ワムシへの紫外線照射を細菌汚染の軽減に有効であるとした報告があり³⁶⁾、ここでは 38mWcm^{-2} 、2 分間の照射でワムシ細菌数の 90% 以上を不活化しえたとされ、実用的な紫外線殺菌装置により、実際にターボット *Scophthalmus maximus* 仔魚の飼育実験に応用し、良好な成績を得ている。

著者の結果がこれら報告と異なった原因は明らかではないが、強力な紫外線を短時間照射して細菌数を下げたワムシが仔魚に速やかに食い尽くされるのならば、ワムシの活力はさほど考慮せずともよいのかもしれない。詳細な検討が今後必要であろう。

いずれにしても、投与前のワムシに“薬浴を兼ねた 2 次培養”を行う方法は特別な設備を必要とせず実用性が高いと判断された³⁷⁾。しかし、薬剤使用基準や耐性菌出現の可能性等を考慮すると、薬浴処理には少なからず問題があるとも考えられる。

一方、著者が別に確認したところによると、配合飼料の一般細菌数は 1 g 当たり最高でも $10^3 \sim 10^4$ CFU/g であり、また B T B 細菌はほとんど含まれなかった。したがって、餌料生物併用の必要のない配合飼料の開発と利用こそが、仔魚期の病害予防対策としてはより有効であろう。

2. ワムシとアルテミア (BS) の細菌叢に及ぼす冷凍保存の影響

種苗生産機関では、培養不調に備えた応急対策等のためワムシを冷凍保存することがある。ここで、ワムシおよび BS の冷凍保存がそれらの細菌叢に及ぼす影響について検討した。

材料および方法

いわゆるナンノクロプシス(あるいは海産クロレラ) *N. oculata* とパン酵母 (オリエンタル酵母) を投与して 22°C で培養したワムシを材料とした。BS としては、 27°C の海水 200l に 120 g の中国産耐久卵を収容して 48 時

間後に収穫したノープリウスを用いた。いずれの材料もプランクトンネットを用いて清浄な海水で洗浄し、次いでネットの裏側から余分な水分を除いた。これをおよそ1 g (湿重量) ずつビニール袋に入れて-15℃の保存庫に収めた。以後、経時的に1袋ずつ取り出して試験に供した。

細菌検査にあたっては既述の方法を用いた。一般細菌数については、その組成を簡易鑑別法²⁹⁾にしたがって明らかにした。

結果および考察

ワムシ1 g 当たりの一般細菌数は、33日間の冷凍によって 6.5×10^8 から 1.5×10^7 へとわずかに減少した (Table 2-2)。一方、 2.9×10^8 あったBTB細菌数の減少は著しく2日後には2桁下がり、33日後には5桁減少して 3.8×10^3 になった。その際の各菌群の菌数変化をみると、*Moraxella*の減少は2桁にとどまったが、*Vibrio* spp. - II (アルギニン分解-, リジン分解+の *Vibrio*, Muroga *et al.*,²⁹⁾) は3桁減少した。また、 2.2×10^8 あったBSの一般細菌数は、ワムシと比べて減少の度合いが大きく、1日後には2桁、34日後には3桁減少し、98日後には検出限界 (1.4×10^3 CFU/g) 以下になった。この時の一般細菌の組成変化をみると、半数以上を占めていた *Vibrio* は急速に減少し、*Moraxella* や *Pseudomonas* の割合が大きくなっていった。

以上のごとく、-15℃で冷凍保存することにより、ワムシおよびBSのいずれにおいても、*Vibrio* が著しく減少することが明らかにされ、その減少の度合いはNFS浴よりも大きかった。ワムシやBSの冷凍に関する報告はみあたらないが、Sugahara *et al.*³⁸⁾ はサバ肉ホモジネートを-20℃で60日間貯蔵すると、*Vibrio* が検出され

なくなり、*Pseudomonas* と *Moraxella* が主となる現象を報告している。これらの現象は、餌料生物や魚肉中に存在する *Vibrio* が、*Moraxella* や *Pseudomonas* に比べて冷凍に対する抵抗性が低いためと考えられた。

3. ワムシに人為的に取り込ませた魚病細菌に対する冷凍保存の影響

前述の結果に基づいて、魚病細菌を実際に取り込ませたワムシを冷凍保存して供試菌の消長を検討した。

材料および方法

養殖アユのみならず種苗生産期のアユの病原菌としても知られている *V. anguillarum*²⁶⁾ と、やはり種苗生産期のヒラメの腸管白濁症^{39, 40)} の原因菌である *V. ichthyenteri*⁴¹⁾ とを供試した。培地としては食塩を2%に調製したハートインフュージョン寒天培地(日水)を使用した。

当センターで約25℃で大量培養していたワムシを適量収穫し、清浄な海水で洗浄した後、滅菌海水に1万個体/mlになるよう再浮遊させたものを2本用意した。次いで、平板で2日間培養した *V. anguillarum* PT-81049株 (J-O-1型) と *V. ichthyenteri* F-8702株の培養菌体を1.0mg/mlになるようそれぞれに添加し、約25℃で静置して、供試菌を取り込ませた⁴²⁾。1時間後、ワムシをそれぞれ収穫して海水で洗浄し、約1 g ずつビニール袋に小分けして、-15℃に保存した。比較のため、滅菌海水で調製した細菌懸濁液 (10mg/ml) も同様に冷凍保存した。

なお、試験開始時のワムシの細菌数は 6.3×10^8 CFU/g だったが、供試菌と同種の菌が検出されないことを別途確認した。細菌検査は培地のほかは既述の方法に従った。

Table 2-2. Effects of freezing (-15℃) on bacterial count and flora of rotifers and brine shrimp nauplii

Storage time (days)	ZoBell agar *1 (Bacterial type)						BTB agar *2	
	Total	V-I*4	V-II*5	P-III, IV*6	M*7	U*8	Total	
Rotifer	0	6.5×10^8		1.6×10^8		4.2×10^8	6.5×10^7	2.9×10^8
	2	1.4×10^8		6.0×10^6		1.3×10^8		6.1×10^6
	8	1.3×10^8		9.3×10^6		1.2×10^8		6.4×10^7
Bacterial count (CFU*3/g)	33	1.5×10^7		8.3×10^5	4.2×10^4	9.2×10^4		3.8×10^3
Brine shrimp	0	2.2×10^8	1.8×10^7	9.0×10^7			1.1×10^8	2.5×10^8
	1	7.4×10^6		1.9×10^6	3.1×10^4	6.2×10^5	1.8×10^6	3.9×10^6
	5	3.0×10^6	5.4×10^5	1.8×10^5	2.0×10^6	3.6×10^5		5.0×10^5
	34	7.8×10^5		1.1×10^5	1.1×10^4		5.6×10^5	1.0×10^5
	98	1.7×10^5			4.2×10^4	1.1×10^5	1.4×10^4	

*1 ZoBell's 2216e agar. *2 BTB teepol agar. *3 colony forming unit. *4 *Vibrio* spp. - I. *5 *Vibrio* spp. - II. *6 *Pseudomonas* - III, IV.

*7 *Moraxella*. *8 unidentified. (Classification of isolated bacteria was based on Muroga *et al.* 1987)

ワムシに存在する多数の菌と供試菌との区別はコロニーの外観で行った。

取り込み終了時に菌数を確認したほか、冷凍後2, 5, 10, 20, 30, および40日目に小分けしたサンプルを取り出し、供試菌の生残数を測定した。

また、葉浴との比較を行うために、取り込み終了後のワムシを5,000個体/mlに再浮遊させた滅菌海水に、NFSを10mg/lになるよう添加して、2, 4, 6 および8時間後の菌数を測定した。

結果および考察

ワムシに取り込ませた魚病細菌の冷凍状態における経時的消長を、滅菌海水中での変化と比較してTable 2-3に示した。そこに示したように、試験開始時にはいずれのサンプルにおいても 10^8 CFU/g・ml以上あった*V. anguillarum*および*V. ichthyenteri*の両菌株とも、日数の経過とともに減少し、冷凍後30あるいは40日後には冷凍ワムシおよび冷凍海水中のいずれからも検出されなくなった。一方、表には特には示さなかったが、比較のため実施したNFS浴でも供試菌の数は時間経過とともに減少した。しかし、8時間後に至っても両菌株ともワムシ中に 10^6 CFU/g以上存在していた。

以上の結果、ワムシを一定期間冷凍保存することで、ワムシ中の魚病細菌を含めた*Vibrio*属細菌を大きく減少させ得ることがわかった。その効果はNFS浴より顕著であり、薬剤耐性菌の出現を招く可能性がなく、さらに*Vibrio*の減少効果が時にみられないNFS浴と異なり細菌叢の影響を受けにくいなどの利点が考えられる。

病原性のある*V. anguillarum*がワムシ中に含まれていた場合の仔稚魚に与える影響について確かなことはわかっていないが、菌数が検出限界以下にまで減少するのならば、感染症の予防効果を期待することが的外れとは考えられない。一方、*V. ichthyenteri*の病原性は必ずしも激烈ではなく、本菌が高濃度に餌料中に含まれてい

た場合にのみ発症、斃死に至ること、仔魚は感染するが稚魚は抵抗性を有すること等が既に明らかにされている^{39, 40)}。そうであれば、冷凍保存によって餌料生物中の本菌をあらかじめ減少させてから感染の危険性の高い時期の仔魚に活きたワムシのかわりに投与すれば、腸管白濁症の発生を予防できると考えられた。無論、病原性のある*Vibrio*はこれら2種だけではなく、また有害な細菌が*Vibrio*以外に存在しないわけでもないが、広範囲の細菌を減少させる点で冷凍処理法は優れている。

多くの場合、人工生産海産魚の開口直後の仔魚は遊泳力が乏しく、摂餌能力も低い。冷凍ワムシの沈降速度が比較的速く、過給餌すれば底質悪化を招きやすいとも考えられるので、飼育開始早々から冷凍ワムシのみを与えることには問題がある。しかし、遊泳力、摂餌能力が十分に発達してから冷凍餌料に切り替える工夫をすれば、仔稚魚期の魚病の防止に役立つ可能性があると考えられた。

第三章

ワムシにおける*Vibrio*, *Pseudomonas*, および*Moraxella*分離菌株の動態に関する実験的アプローチ

ワムシとそれが保有する細菌とのいわば生態学的な相互関係に関する検討例は少なく、パン酵母のみを給餌した無菌ワムシに対して、ワムシ培養槽由来のビタミンB12高濃度産生*Pseudomonas*株を大量投与すると増殖が促進されたとする報告⁴³⁾などがわずかにあるに過ぎない。

ところで、ワムシが魚病細菌である*V. anguillarum*をわずか30分程度で極めて高濃度に取り込み、しかも清浄海水中に移しても2時間にわたって菌数が減少しなかったというMuroga and Yasunobuの報告⁴²⁾は、ワムシと細菌、特に*Vibrio*との相互関係を考えるうえで極めて興味深いものがある。

しかし、このような実験を行う場合、ワムシがもとも

Table 2-3. Effects of freezing (-15°C) on survival of *Vibrio anguillarum* and *V. ichthyenteri* in rotifer and seawater

Species	Sample	Storage time (days)						
		0	2	5	10	20	30	40
<i>V. anguillarum</i>	R*1	$7.3 \times 10^{8*2}$	1.4×10^8	4.0×10^7	1.1×10^7	7.2×10^6	7.8×10^6	$<1.5 \times 10^3$
	PT-81049(J-0-1)	S*3	$5.0 \times 10^{9*4}$	1.4×10^9	3.3×10^8	1.1×10^7	1.5×10^5	$<1.6 \times 10^3$
<i>V. ichthyenteri</i>	R	3.7×10^8	5.3×10^6	1.4×10^6	8.7×10^5	7.9×10^4	$<1.0 \times 10$	
	F-8702	S	5.6×10^8	3.4×10^8	5.9×10^7	6.4×10^5	1.0×10^5	$<1.0 \times 10$

*1 Rotifer, *2 CFU (on Heart-Infusion Agar with 2% NaCl)/g, *3 Seawater, *4 CFU (on HIA)/ml

と保有している大量の細菌が実験結果に何等かの影響を与えている可能性は否定できない。また、供試した細菌の数が減少した場合には、適当な選択培地もしくは特異な性状を有する菌株を用いないと、他の大量の菌によって供試菌株が隠されてしまい、計数が不可能になることも考えられる。

そこで著者は、ワムシに抗生物質を作用させて菌数を一旦下げた後に、ワムシに由来する任意の菌株を取り込ませることにより、特定の優占菌からなる細菌叢を有するワムシを作出し、さらに滅菌海水中にワムシを移してその菌数の増減を観察するなどして、ワムシ中における細菌の動態について検討し、いくつかの知見を得た。

材料および方法

ワムシおよびその前処理 当センターで屋内40klコンクリート水槽を用い、海水で培養した*N. oculata*と、パン酵母および油脂酵母（協和発酵）を投与して大量培養しているワムシ（S型）を材料とした。

前処理として抗生物質を作用させる場合は、市販のペニシリン、ストレプトマイシン混合液（Whittaker Bioproducts Inc., ペニシリンG 25,000単位およびストレプトマイシン 25,000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ）を使用し、ワムシが飢餓状態にならぬよう濃縮された市販の*N. oculata*（マリンアルファ、日清製油）も併用した。すなわち、ワムシ培養棟から場内実験室にワムシの濃厚浮遊液（30,000～60,000個体/ml）を持ち帰り、ワムシ、ペニシリン、ストレプトマイシン、マリンアルファのそれぞれの最終濃度が5,000または10,000個体/ml、3,000単位/ml、3,000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、および1%になるように、実験の都度必要量を三角フラスコに清浄な海水で調製した。実験により調製量は異なっていたが、300～700mlの範囲であった。水温25.2～28.2℃で、約200ml/分程度の弱い通気をしながら4時間作用させ、これを前処理（以下P S処理と記す）とした。通常 $10^7 \sim 10^9$ CFU/gに達していたワムシの細菌数は、このP S処理により $10^3 \sim 10^4$ CFU/gにまで低下した。

なお、このP S処理については、いくつかの薬剤濃度を設定して経時的に菌数変化を観察する予備試験を行ったが、菌数減少の早さや程度は、薬剤濃度に必ずしも比例せず、細菌組成に大きく影響されていた。そこで、いつも一定した菌数のワムシが得られるとは限らなかったが、一応上記の薬剤濃度と作用時間で本研究には十分な程度にワムシの菌数が減少する事を確認したので、以下すべてこの条件に統一した。

菌株 1989年5月から6月にかけて当センターのワムシからZoBell寒天培地を用いて分離した46菌株の中から、主たる構成菌群であった*Moraxella*, *Pseudomonas*, *Vibrio* spp.-I（アルギニン+、リジン-；*V. anguillarum*などが含まれる）、II（アルギニン-、リジン+；*V. vulnificus*などが含まれる）、およびIII（アルギニン-、リジン-；*V. ordalii*などが含まれる）の5菌群を中心に10菌株（*Vibrio* spp.-Iおよび未分類群各1株、他は各2株ずつ）を選んで実験に供した。なお、それらの細菌の分類はMuroga *et al.*の簡易鑑別法²⁹⁾に従い、また実験にはZoBell寒天培地にて25℃で24時間培養したものを供した。

ワムシにおける細菌の取り込み（実験1） 5,000個体/mlのワムシ密度でP S処理を行った。その後、ワムシをプランクトンネットを用いて収穫し、あらかじめ5つのフラスコに用意した各200mlの滅菌海水に、それぞれ約50万個体ずつ収容した。

一方、*Moraxella*, *Pseudomonas*, *Vibrio* spp.-I, II, およびIIIの5菌群から各1株ずつを選び、 1.0×10^8 CFU/mlの濃度になるようそれぞれのフラスコに懸濁させ、25℃のインキュベーター中でワムシにそれぞれ取り込ませた。1, 2, および4時間後に既述の方法でワムシ1g（湿重量）当たりの菌数を測定した。なお、ここではB T Bティモール寒天培地を使用せず、供試菌株の他との判別はすべてZoBell寒天培地上におけるコロニーの肉眼的形状によった。

ワムシに細菌を取り込ませている間、通気は行わなかったが、時々静かに揺り動かし、4時間経過後もほぼすべてのワムシが活発に遊泳していることを確認した。

取り込み後の菌数変化（実験2） 本実験には10菌株すべてを供した。ワムシ密度1万個体/mlでP S処理後、全量をプランクトンネットで収穫して水を切り、滅菌海水で軽く洗った。その後、滅菌海水で5,000個体/mlになるよう希釈し、200mlずつ三角フラスコに取り、それぞれの菌株を 1.0×10^8 CFU/mlの濃度に懸濁させ、室温下（27.3～27.8℃）で1時間取り込ませた。この間通気はしなかった。

1時間経過後、全量をプランクトンネットにとって滅菌海水で軽く洗い、一部を菌数測定に供し、残りを直ちに滅菌海水200mlに再浮遊させた。1時間ごとに滅菌海水を全量取り替えながら、2, 4, および6時間後のワムシの菌数を培養法により測定した。この間の水温は26.5～27.5℃であった。

その後、25℃のインキュベーター中に静置し、実験

開始から20時間後にもワムシの活性を確認した後、菌数を測定した。

ワムシによる細菌の不活化と排出(実験3) 実験2と同様の方法にて細菌を1時間(水温25.7~26.1℃)取り込ませたワムシを収穫して水を切り、一部を菌数測定に供するとともに残り(0.4~0.6g)を秤量して、あらかじめ用意した200mlの滅菌海水に移し、25℃のインキュベーター中に置いた。2時間後に100mlを取り、ワムシと海水の菌数それぞれを測定した。4時間後も同様に残りの100mlについて菌数の測定を行った。本実験には *Moraxella* および *Pseudomonas* の各2株のみを供した。

ワムシ代謝産物の細菌に及ぼす影響(実験4) 滅菌海水100mlに対して、1.0g(湿重量)のワムシを懸濁させ(約5,000個体/mlに相当する)、25℃で2時間置いた後、その海水からプランクトンネットでワムシを除去し、さらに0.45μmのメンブレンフィルターで濾過除菌した。COD(化学的酸素要求量)測定に一部を供したほか、9.0mlずつ4本の試験管にこの濾液を分注した。実験3に用いた4菌株で、滅菌海水を用いて0.05mg/mlの菌液を作製し、1.0mlずつ上記の試験管に接種した。対照として新鮮滅菌海水と0.01%ペプトン海水(Difco Bacto-Peptoneを使用)を用意して同様に菌液を接種し、比較に供した。0, 2, および4時間後に菌数を測定した。

結 果

ワムシにおける細菌の取り込み(実験1) 実験結果をFig.3-1に示した。そこに明らかなように、僅か1時間後にはいずれの菌株もワムシによって $10^7 \sim 10^8$ CFU/g

の高濃度に取り込まれていた。ただし、*Moraxella* および *Pseudomonas* の取り込み量はそれぞれ 6.2×10^7 および 1.1×10^7 CFU/gであり、*Vibrio* の各菌株で得られた $8.9 \times 10^7 \sim 8.7 \times 10^8$ CFU/gに比べてやや濃度が低かった。

取り込み後の菌数変化(実験2) Table 3-1に示されたように、菌浴処理後のワムシの菌数はばらつきが大

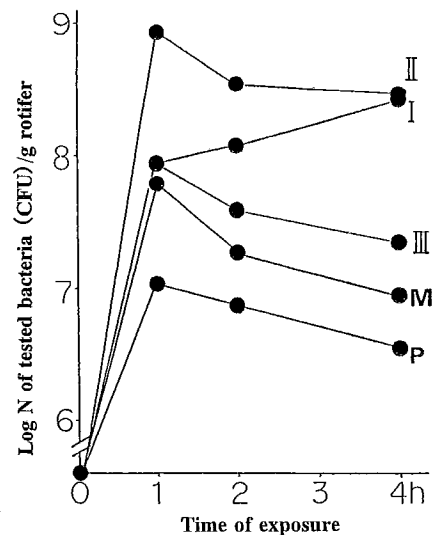


Fig.3-1. Uptake of test bacteria by medicated rotifers during 4h exposure.

Each bacterium was added into rotifer suspensions(2,500 individuals/ml) at 1.0×10^8 CFU/ml.

M: *Moraxella* sp. ROS-8903, P: *Pseudomonas* sp. ROS-8902, I: *Vibrio* sp.- I ROS-8913, II: *Vibrio* sp.- II ROS-8908, III: *Vibrio* sp.- III ROS-8914.

Table3-1. Changes of bacterial number (CFU/g) in rotifers after the termination of exposure to the bacterial suspensions

Bacterial strain	Time (hours) after rotifers were transferred from each bacterial suspension to sterile seawater *1					
	0h	2h	4h	6h	20h	
<i>Vibrio</i> sp.- I ROS-8913	$2.5 \times 10^7(100)^{*2}$	$5.8 \times 10^7(100)$	$1.5 \times 10^8(100)$	$3.6 \times 10^8(100)$	$1.7 \times 10^9(100)$	
<i>Vibrio</i> sp.- II ROS-8908	$3.5 \times 10^7(100)$	$3.8 \times 10^7(100)$	$4.1 \times 10^7(100)$	$1.3 \times 10^8(100)$	$7.0 \times 10^8(66)$	
	ROS-8923	$2.4 \times 10^8(100)$	$1.4 \times 10^8(100)$	$2.3 \times 10^8(100)$	$6.6 \times 10^8(100)$	$1.1 \times 10^9(82)$
<i>Vibrio</i> sp.- III ROS-8914	$8.3 \times 10^6(100)$	$2.3 \times 10^7(100)$	$1.4 \times 10^8(100)$	$4.3 \times 10^8(100)$	$2.3 \times 10^9(98)$	
	ROS-8918	$1.5 \times 10^8(100)$	$8.7 \times 10^8(100)$	$3.1 \times 10^8(100)$	$3.0 \times 10^8(100)$	$2.0 \times 10^9(100)$
<i>Moraxella</i> sp. ROS-8903	$2.9 \times 10^7(100)$	$7.3 \times 10^6(100)$	$5.2 \times 10^6(74)$	$8.9 \times 10^6(82)$	$8.3 \times 10^7(21)$	
	ROS-8926	$4.5 \times 10^7(100)$	$4.4 \times 10^6(100)$	$4.4 \times 10^6(100)$	$1.3 \times 10^7(100)$	$6.3 \times 10^8(68)$
<i>Pseudomonas</i> sp. ROS-8902	$1.2 \times 10^7(100)$	$1.3 \times 10^6(57)$	$1.8 \times 10^6(68)$	$5.3 \times 10^6(84)$	$1.3 \times 10^8(21)$	
	ROS-8930	$7.1 \times 10^7(100)$	$1.4 \times 10^7(100)$	$1.7 \times 10^6(100)$	$6.8 \times 10^6(100)$	$1.4 \times 10^7(48)$
Unidentified ROS-8917	$4.6 \times 10^7(100)$	$6.7 \times 10^6(100)$	$3.5 \times 10^6(100)$	$3.1 \times 10^5(100)$	$6.6 \times 10^8(80)$	

*1 Sterilized seawater was exchanged at one-hour intervals.

*2 ():percentage of the tested strain in the detected total bacterial number in rotifers.

大きく, *Vibrio* spp.-IIIの1株でみられた 8.3×10^6 CFU/gから, *Vibrio* spp.-IIでみられた 2.4×10^8 CFU/gまで幅があった。*Vibrio* 5株を平均すると 9.2×10^7 CFU/gとなり, *Vibrio*以外の5株の平均値 4.1×10^7 CFU/gと比べてわずかに高かった。しかし, 4~6時間後までの菌数変化とそれ以後の優占率には顕著な違いがあった。すなわち, 1時間ごとに滅菌海水を取り換えたにもかかわらず, *Vibrio*を供試した5例においてはワムシの菌数は減少することなく, 6及び20時間後には 10^9 CFU/g前後にまで増加していた。また, その組成をみるといずれの場合も接種菌によりほとんどを占められていた。

一方, *Vibrio*以外の菌株を供試した5例においては, 4時間後にかけてワムシ中の菌数はいずれも一旦減少し,

その後増加に転じた。しかも, 20時間後においてさえ, 供試菌株が66~100%を占めていた*Vibrio*の場合と異なり, この5例においては, P S処理により $10^3 \sim 10^4$ CFU/gにまで減少していた元々の保有細菌が, 20時間後には供試菌株に匹敵するほどに増加しており, 供試菌株の優占率は21~80%にまで低下していた。

ワムシによる細菌の不活化と排出(実験3) 供試菌を取り込ませた後に滅菌海水に移したワムシの総細菌数(収容重量当たりの菌数)および海水中の総細菌数(200ml当たりの菌数)の経時的な変化をTable 3-2に示した。それによると, 2時間後における海水200ml当たりの菌数は, どの菌株の場合も $10^5 \sim 10^6$ CFU/gに達していた。また, ワムシにおける菌数の変化をみると, 滅

Table3-2. Changes in number of *Moraxella* and *Pseudomonas* in rotifers after the termination of exposure to the bacterial suspensions

Strain	Times (hour) after rotifers were transferred to sterile seawater*1							
	0h	2h		4h		B/A	C/(A-B) (%)	
	A Total(CFU/200ml)= Rotifer*2 + Seawater*3	Total=Rotifer+Seawater		B Total=Rotifer+Seawater	C			
<i>Moraxella</i> sp.	ROS-8903	$4.6 \times 10^7 = 4.6 \times 10^7 + 0$	$2.3 \times 10^7 = 1.3 \times 10^7 + 9.5 \times 10^6$		$1.2 \times 10^7 = 6.4 \times 10^6 + 5.1 \times 10^6$		0.26	14.8
	ROS-8926	$2.2 \times 10^7 = 2.2 \times 10^7 + 0$	$4.8 \times 10^7 = 3.1 \times 10^7 + 1.8 \times 10^6$		$5.5 \times 10^7 = 4.8 \times 10^7 + 6.4 \times 10^6$		2.50	—
<i>Pseudomonas</i> sp.	ROS-8902	$2.9 \times 10^7 = 2.9 \times 10^7 + 0$	$2.7 \times 10^6 = 1.5 \times 10^6 + 1.2 \times 10^6$		$2.3 \times 10^6 = 2.1 \times 10^6 + 2.2 \times 10^5$		0.08	0.8
	ROS-8930	$5.1 \times 10^6 = 5.1 \times 10^6 + 0$	$4.7 \times 10^6 = 4.3 \times 10^6 + 4.7 \times 10^5$		$7.5 \times 10^6 = 7.4 \times 10^6 + 2.9 \times 10^1$		1.47	—

*1 Sterile seawater was not changed.

*2 Bacterial count of whole rotifers in the experimental water(200ml).

*3 Bacterial count of water (200ml).

Table3-3. Growth (CFU/ml) of *Moraxella* and *Pseudomonas* strains in spent seawater used for rotifer culture

Bacterial Strain			0h	2h		4h	
			(A)	(B)	(B/A)	(C)	(C/A)
<i>Moraxella</i> sp.	ROS-8903	SS	1.3×10^6	1.8×10^6	1.3	3.5×10^6	2.6
		PS	1.3×10^6	3.7×10^6	2.7	3.9×10^6	2.9
		C	1.3×10^6	2.3×10^6	1.7	2.3×10^6	1.7
<i>Moraxella</i> sp.	ROS-8926	SS	5.1×10^5	6.2×10^6	12.3	8.0×10^6	15.8
		PS	5.1×10^5	4.3×10^6	8.5	4.1×10^6	8.1
		C	5.1×10^5	2.4×10^6	4.7	2.2×10^6	4.4
<i>Pseudomonas</i> sp.	ROS-8902	SS	1.0×10^6	9.8×10^5	0.9	1.9×10^6	1.9
		PS	1.0×10^6	1.3×10^6	1.2	4.3×10^6	4.1
		C	1.0×10^6	2.8×10^6	2.7	2.3×10^6	2.2
<i>Pseudomonas</i> sp.	ROS-8930	SS	3.7×10^5	2.3×10^6	6.1	4.4×10^6	11.8
		PS	3.7×10^5	2.1×10^6	5.8	6.0×10^6	16.1
		C	3.7×10^5	5.8×10^5	1.6	2.1×10^6	5.7

SS:Spent seawater used for rotifer culture (5,000 individuals/ml for 2h) (COD =2.15mg/l),

PS:0.009% Peptone seawater (Difco Bacto-Peptide) (COD=8.02mg/l), C:Control (sterilized fresh seawater) (COD =0.10mg/l).

少した株 (ROS-8903株とROS-8902株) と増加した株 (ROS-8926株とROS-8930株) とに分けられ、それは菌株の属とは関連がなかった。前者について4時間後までにおける菌数の減少分に占める排菌の割合 (Table 2の $C / (A - B)$) を計算してみると、*Moraxella* sp. ROS-8903株では14.8%、*Pseudomonas* sp. ROS-8902株ではわずかに0.8%と低かった。

ワムシ代謝産物の細菌に及ぼす影響 (実験4) Table 3-3に示されたように、実験3でワムシの影響による菌数の著しい減少がみられた2株 (ROS-8903株およびROS-8902株) は、ここでは菌数の増加がほとんどなく、4時間で対照の滅菌海水と同様わずか2倍前後までしか増殖していなかった。一方、実験3において2.5または1.5倍に菌数の増加が認められた残る2株 (*Moraxella* sp. ROS-8926株および*Pseudomonas* sp. ROS-8930株) は、この試水中で著しい増殖を示し、4時間で15.8あるいは11.8倍にまで菌数が増加していた。

考 察

複数の抗生物質を使って材料を無菌にしたり、雑菌の混入や増殖を防いだりする手法は、真菌、ウイルス等の分離や培養^{44,46)}、またワムシの無菌培養等^{47,48)}にも使われ比較的広く知られている。試料1gまたは1ml当たりストレプトマイシンとペニシリンをそれぞれ100~1,000 μ gおよび100~1,000単位用いる手法が一般的であり、ここでもこれら2剤を用いたが、先にも触れたように今回の使用濃度や時間ではワムシを無菌化するまでには至らなかった。しかし、わずか4時間で $10^3 \sim 10^4$ CFU/gにまでワムシの菌数が減少したこと、その後の菌の取り込みへの影響が特に観察されなかったこと、 $10^7 \sim 10^8$ CFU/gに及ぶ供試菌が取り込まれ、事実上純粹とみなしうる菌叢が構成されたことなどから本研究にも十分応用可能と判断された。以下実験結果について考察を加える。

実験1の結果、その厳密な機構については不明であるものの、ワムシが短時間のうちに極めて高濃度に細菌を取り込むことが確かめられた。パン酵母を使ってワムシの最小摂餌粒子径を求めたHino and Hirano⁴⁹⁾は、背甲長約240 μ mのワムシではその値はおおよそ4.5 μ mであることを示唆している。今回使用した細菌の大きさは1~2 μ mであったのでそのままでは効率的に取り込むことは困難と考えられるが、いわゆるフロック状になることで摂取可能な状態に変化し⁵⁰⁾、ワムシの消化管に取り込まれたものと推定された。ただし、ワムシの体表面

等に細菌が付着している可能性もあり、その判別には形態学的な観察が必要と考えられた。

実験2において、4~6時間経過以後に10株すべてで観察された菌数の増加は (Table 3-1)、飢餓によるワムシの生理状態の失調に起因したものと推測される。また、環境水を取り換えても*Vibrio*の菌数が減少しなかったことから、ワムシ中において*Vibrio*の生残や増殖が十分に可能であることがわかったが、両者の関係がある種の共生であるのか、あるいは寄生であるのかは不明である。ただし、20時間後においてもほとんどすべてのワムシが活発に遊泳していたことから考えて、少なくとも今回供試した菌株がワムシを短時間で致死させることはないと思われた。

一方、*Vibrio*以外の5菌株で観察された菌数の一時的な減少の多くは排菌によるものではなく、大部分はワムシの消化酵素等^{51,52)}に起因した失活によると考えられた。また、このことを明らかにするために実施した実験3および4の結果を実験2と比較することにより、ワムシ中で不活化されやすい菌株が*Moraxella*や*Pseudomonas*に属すること、および一部の菌株ではワムシ代謝産物 (細菌等の微生物の代謝産物を含む) によって水中の菌の増殖が著しく促進され、その度合いはワムシによる取り込みや不活化をはるかに上回るものであることなどが明らかになった。

Vibrio、*Pseudomonas*、および*Acinetobacter*など300株を用いてワムシに対する餌料価値を検討した安田・多賀⁵³⁾は*Pseudomonas*の一部に高い有効性を認め、その逆に*Vibrio*はワムシに摂餌されないか、未消化のまま排泄されると推察している。また、砂濾過海水中にワムシを浮遊させて5時間後までの細菌叢の変化を観察したTanasomwang and Muroga³⁴⁾によっても、*Vibrio*の比率の上昇ならびに*Moraxella*と*Acinetobacter*の低下が認められており、ともに今回と似通った現象として興味を引かれる。

以上の結果を総合すると、ワムシに取り込まれた後の細菌の挙動は大きく2つに分けられることが判明した。すなわち、ワムシに対する親和性と抵抗性が極めて強く、取り込まれた後もワムシの生理作用に抵抗して定着、生残し、さらには増殖している*Vibrio*と、取り込まれた後は培養水からの新たな菌の供給がなければ、速やかに失活して菌数の減少が観察される*Moraxella-Pseudomonas*グループの2菌群である。*Vibrio*とワムシとの関係はある種の寄生または共生、ワムシと*Moraxella-Pseudomonas*は基本的には捕食者・被捕食者の関係にあると推定され

る。両者の違いは、ワムシに対する菌の親和性および抵抗性の強弱に起因していると推測されるが、この事実が実際のワムシ培養水槽において生態学的にどのような意味を持っているのか興味深い問題である。また、上記のごとく抵抗性に著しい差があるにもかかわらず、*Vibrio* が必ずしもワムシの細菌叢の主体を占めているわけではないこと⁵⁴⁾ は、何等かの他の要素、例えば細菌相互の拮抗や干渉、あるいはワムシの生理状態、系統や培養方法の違い、またワムシ培養水槽中の酵母や原生動物の関与を窺わせ、問題が決して単純ではないことを示唆している。

なお、最近 Rombaut *et al.*⁵⁵⁾ はグルタルアルデヒドを用いてワムシ *B. plicatilis* の耐久卵を消毒することにより無菌的なワムシ培養を可能にした。彼らは、ワムシから分離した20種類の細菌を1種類ずつ添加することにより、それぞれの細菌種のワムシの成長に対する影響を調べたうえで、ワムシの成長を促進するような細菌のみを用いたワムシの培養が可能であることを示している。この手法は今後魚病細菌汚染の低減化にも応用しうると考えられる。

第IV章

餌料生物の薬浴と冷凍保存が仔稚魚に及ぼす影響

1. クロダイ仔稚魚の成長、生残、および消化管内細菌叢に及ぼす餌料生物のNFS浴と冷凍保存の影響

魚介類の種苗生産過程において餌料として投与されるワムシやBSが、極めて多くの細菌によって汚染されている事実をこれまで著者は明らかにしてきた。餌料生物が病原菌の運搬者となって飼育中の魚介類仔稚魚に悪影響を及ぼす可能性があることは、林ら¹⁴⁾ によって指摘されていたし、マダイ仔魚において *V. alginolyticus* 感染症が、またアユ仔魚においては *V. anguillarum* 感染症が、ともにワムシを経由して発生したと推定されることを、それぞれ岩田ら⁵⁶⁾ および田畑ら²⁶⁾ が報告している。また、ワムシを使った経口法で、クロダイ *Acanthopagrus schlegelii* 仔魚に対する復元試験を行い、*V. alginolyticus*、*V. nereis* および *Alcaligenes cupidus* のいわゆる腹部膨満症への関与を指摘した楠田らの報告⁵⁷⁾ もある。さらに、田谷ら²⁷⁾ は、アユ種苗生産中のワムシから *V. anguillarum* を高率に検出し、餌料生物が病原菌の供給源になっていると述べている。また、ヒラメ仔魚の腸管白濁症について行われた詳細な研究^{39, 40)} では、*V. ichthyoenteri* に汚染された餌料生物が

原因となりうることが示されている。

種苗生産現場においては病害予防の観点から、これら餌料生物の細菌汚染を軽減し、飼育環境への病原菌の侵入を防ぐような様々な対策が採られてきた。特にニトロフラン剤浴は特別な設備を要しないこと、および紫外線照射に比べて効果が優れていること^{14, 15, 34, 54)} などから、比較的広く行われている。事実、第I章でも触れたように、アユ種苗生産事業においては、餌料生物にNFS浴を施した機関の大量斃死発生率は、NFS浴をしない機関のほぼ半分であった。

しかし、餌料生物に対してNFS浴のような細菌汚染軽減対策を講じた場合と、そうでない場合とで、仔稚魚の消化管内細菌叢や飼育魚の成長や生残等にどのような違いが生じるかについて検討された例はみあたらない。そこで著者は、量産規模でクロダイ仔魚に投与されるワムシとアルテミア幼生に対しNFS浴を実施して、無処理の餌料を投与した場合と比較するとともに、冷凍餌料を投与した試験区も設けて検討した。

材料および方法

ワムシとBSの培養およびその処理 当センターの屋内40kl角形コンクリート水槽を用い、20~24℃の水温で、*N. oculata* とパン酵母、および油脂酵母を与えて培養されたワムシ(S型)を餌料として用いた。収穫の2日以上前から油脂酵母のみを投与した。原則として、培養水は全海水としたが、増殖率が低下した場合は適宜水道水を加えて比重を下げた。こうして大量培養したワムシに対して以下の処理を加えてクロダイ飼育試験に供した。

- ①毎日必要な量のワムシを前記の培養槽から収穫し、約2 mg/lの濃度にNFSを加えた *N. oculata* 浮遊液500lに収容して2~6時間薬浴し、これをNFSワムシとした。ワムシあるいは *N. oculata* の濃度、および薬浴時間のかねあいによっては、この間のワムシの栄養価の低下を防ぐために、マリンアルファ(主成分 *N. oculata*) を500ml加えた。
- ②1989年3月13日に前記の1培養水槽のほぼすべてのワムシを収穫し、十分に水分を除いた後、500gずつ小分けして、-30℃で冷凍し、これを冷凍ワムシとした。後述するように、42日以上冷凍保存した後、4月24日(17日齢)から投与した。
- ③細菌汚染軽減のための特別な処理を行わず、ワムシを *N. oculata* 浮遊液に①と同じ時間だけ収容して2次培養した後、仔魚に投与した。これを無処理ワムシとし

た。

B Sについては以下の処理を加えた。①27℃の海水に1~2 g/lの密度になるようB Sの耐久卵(中国産, 日配くるまえば)を添加し, 強く通気した。24時間後にエスター85(日清製油)とNFSをそれぞれ0.1ml/lおよび5 mg/l加え, さらにその24時間後に幼生を収穫し, これをNFS-B Sとした。②NFSを用いなかったほかは, ①のB Sと同じ条件でふ化させ, 本飼育試験に必要な量のすべてを3月15日および17日に収穫した。冷凍ワムシと同様に水を切った後, 500 gずつ-30℃で冷凍した。これを冷凍B Sとし, 4月24日から投与した。③NFS-B Sや冷凍B Sと同じ条件で, 海水に耐久卵を収容した後, 24時間後にエスター85を加え, 48時間後に収穫した。細菌汚染軽減のための特別な操作を行わず, これを無処理B Sとした。

その他の餌料 クロダイ親魚から採卵し分離した浮上卵を, 生のまま, あるいは冷凍保存しておいて仔稚魚に投与した。また, 配合飼料としては協和A-1およびA-2(協和発酵), およびたい種苗生産用飼料前期用No.2(日清製粉)を適宜用い, 12日齢から取り上げの前日である45日齢まで, 1日3~5回, 3区それぞれの水槽に適量を投与した。

飼育の概略と試験区の設定 当センターの屋内35kl角形コンクリート水槽3面を使用した。別の陸上水槽で飼育していたクロダイ親魚(278尾, 性比不明, 4~6歳魚)から1989年4月5日朝に採卵し分離した浮上卵を, 微流水下で約24時間管理した。次いで, 分離操作を再度行い, 死卵を除き, あらかじめ 1×10^6 細胞/ml程度の濃度になるように*N. oculata*を加えて満水としておいた上記の3水槽に, この浮上卵を500 gずつ収容した。この時の浮上卵1 g当たりの卵数は1,700粒であった。翌4月7日にふ化は終了した。ふ化率は83.6%であったので, 1水槽のふ化仔魚は71.0万尾ともとめられた。

いずれの水槽も熱交換機を用いて水温を制御し, 約18℃でふ化させた後, 10日齢から徐々に上げて, 13日齢に約20℃とした。41日齢まではほぼ一定を保ったが, その後徐々に下げて, 43日齢には自然水温と同じ約18℃とし, 加温を停止した。飼育当初は止水としたが, 12日齢からは1.3回転/日程度の微流水とした。31日齢からは約2.5回転/日に増量し, さらに41日齢からは約3.7回転/日とした。原則として1日1回, 自動または手動で底掃除を行った。

記述の3水槽を, 1水槽ずつ以下の3試験区とし, 餌料生物の投与前処理や投与期間に差を設けた。それぞれ

の餌料系列をFig. 4-1に示し, 飼育経過の概要とともに以下に述べる。

I. NFS区 5日齢から11日齢までは1日1回NFSワムシを投与し, 飼育水中のワムシ密度を5~10個体/mlに維持した。クロダイ仔魚の摂餌能力が向上した12日齢以後は, 1日3回配合飼料を投与するとともに, 注水を始めて水質の安定に努め, また2億個体(飼育水1 ml当たり約5.7個体)程度のNFSワムシの投与を1日1回33日齢までさらに継続した。34日齢から43日齢の間は, 1日1回NFS-B Sを3.2~4.1千万個体与えた。14日齢および18日齢から45日齢まで生のクロダイ浮上卵を与えた。31日齢からは冷凍保存(-30℃, 31日間以上)していた浮上卵もこれに加えた。飼育経過はほぼ順調であったが, 20日齢の時点で, 死亡魚は特に認められなかったものの, 衰弱魚が僅かながら観察されたので, 注水量を変えることなく, NFSを約0.57mg/lになるよう飼育水に添加した。翌日も同じ措置を実施したところ, 衰弱魚は観察されなくなった。

II. 冷凍区 遊泳行動および摂餌行動が緩慢で, 敏捷さを欠く5日齢から16日齢までは無処理ワムシを投与したが, 17日齢から33日齢までは500 gの冷凍ワムシを1日1回袋ごと流水中で10~20分かけて解凍した後, 水槽に撒布して仔稚魚に与えた。また, 17~42日齢の間は500 g, 43~45日齢には1,000 gの冷凍B Sも同様にして1日1回与えた。飼育期間中, 特別な異常は観察されなかった。

なお, 生きたワムシおよびB Sの平均体重を2および

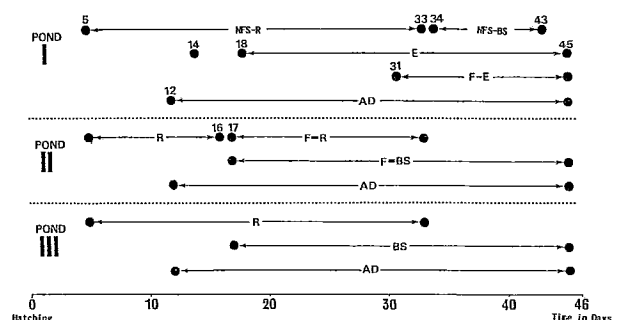


Fig. 4-1. Feeding regimen for black seabream larvae.

Pond I: NFS-R; Rotifer treated with sodium nifurstyrenate (NFS), NFS-B S; Brine shrimp treated with NFS, E: Floating egg of black seabream, F-E; Frozen floating egg of black seabream, AD; Artificial diet.

Pond II: R; Rotifer without NFS treatment, F-R; Frozen rotifer, F-B S; Frozen brine shrimp.

Pond III: BS; Brine shrimp without NFS treatment.

10 μ g とすると、500 g の冷凍餌料は2.5億個体と2.5千万個体とにそれぞれ相当する。また、解凍直後の形態を検鏡観察したところ、崩れた個体はいずれもほとんど認められず、元の形状が保たれていた。生きた餌料に比べて、これら冷凍餌料の沈降速度は明らかに速かったが、クロダイ仔魚は冷凍餌料を極めて活発に摂餌し、目視観察によれば冷凍餌料撒布後10~20分以内で、空胃状態から飽食状態に達していた。

Ⅲ. 無処理区 5日齢から33日齢まで無処理ワムシをNFS区とはほぼ等しく投与した。また17日齢から45日齢までは無処理BSを1日当たり1.5~3.0千万個体与えた。冷凍区と同様に特に異常は観察されなかった。

仔稚魚の消化管内細菌叢 Muroga *et al.*²⁹⁾ の分離方法を用いた。すなわち、それぞれの飼育水槽から無作為に30~40尾の仔稚魚を金属製の茶こしに取り、0.1%塩化ベンザルコニウム液に1分間浸け、次いで上から水道水を静かに30秒間注いだ。この操作を2回繰り返した後、軽く水分を切って、仔稚魚をガラスホモジナイザーにとり、滅菌海水を加えて磨砕した。これを原液として既述の方法に従い細菌検査を行い、クロダイ仔稚魚1尾当たりの生菌数を算出した。一般細菌についてはMuroga *et al.*²⁹⁾ の簡易鑑別法に従って分類を実施し、組成を明らかにした。10, 15, 22, 29, および42日齢の仔稚魚について調査を行った。

餌料の細菌叢 無処理、薬浴、および冷凍保存した餌料についても既述の方法により細菌叢の調査を実施した。

成長 ふ化当日と上述の調査日に、細菌叢調査とは別に各水槽から50尾ずつの仔稚魚を取り、その全長を計測した。また、取り上げ日(46日齢)には100尾ずつを計測した。

生残および活力 46日齢の時点で飼育をうち切り、生残数および生残率を求めた。

ところで、マダイ仔魚は、3~7日齢から10~15日齢の間に水面から空気を呑み込み開腔するが、その時点で仔魚の活力が乏しかったり、水流等で呑み込みが物理的に阻害されるといわゆる閉腔個体となり、後に脊柱前弯症の原因となることが北島ら⁵⁸⁾ によって明らかにされている。クロダイでもほぼ同様の現象が知られており、ともに開腔率は飼育初期の活力の重要な指標の一つと見なされている。そこで22日齢のクロダイ仔魚について各区100尾ずつを検鏡し、鰾の有無を観察して開腔率を求めた。

また取上げた時には、底の浅い小型の手網(約15×

20cm) で稚魚を無作為にすくい取り、そのまま空中に保持した。30秒経過後、75l角形プラスチック水槽に稚魚を移した。これを試験区ごとに2回行い、弱く通気して止水として、24時間後に生残魚と死亡魚をそれぞれ計数し、生残率を求めて比較し、活力試験とした。

結 果

仔稚魚の消化管内細菌叢 各試験区におけるクロダイ仔稚魚1尾当たりの細菌数をTable 4-1に示した。表に示したように、いずれの試験区においても、10日齢の仔魚の一般細菌数およびBTB細菌数はそれぞれ $1.7 \sim 3.6 \times 10^2$ CFU/尾および $4.6 \times 10 \sim 3.6 \times 10^2$ CFU/尾であり大きな差はなかった。15日齢においても全体として1桁程度数値が高くなったが、各試験区とも大きな差はなかった。しかし、20および21日齢に行った飼育魚に対するNFS浴の影響が、22日齢になるとNFS区細菌数が低下していた。特にBTB細菌数の減少は著しく、 2.4×10 CFU/尾まで下がっていた。NFS区の細菌数は、その後やや増加したものの、 $6.3 \times 10^2 \sim 2.0 \times 10^3$ CFU/尾の範囲ではほぼ横這いの状態で推移した。また、冷凍区においては、生きた餌料から冷凍保存した餌料への切り替えを挟んだ15日齢から22日齢にかけてBTB

Table 4-1. Bacterial counts in the intestine of larvae and juveniles of black seabream with different feeding regimens

Pond*	Fish age (Day-old)	Bacterial counts (CFU/fish)	
		ZoBell	BTB
I (NFS rotifer and brine shrimp)	10	1.7×10^2	7.6×10
	15	3.9×10^3	1.1×10^3
	22	8.2×10^2	2.4×10
	29	1.7×10^3	2.0×10^3
	42	1.3×10^3	6.3×10^2
II (Frozen rotifer and brine shrimp)	10	2.2×10^2	4.6×10
	15	1.9×10^3	6.6×10^2
	22	2.0×10^3	1.7×10^3
	29	3.0×10^4	9.6×10^3
	42	5.3×10^2	2.3×10^2
III (Non-treated rotifer and brine shrimp)	10	3.6×10^2	3.6×10^2
	15	2.4×10^3	7.7×10^2
	22	1.4×10^4	1.8×10^4
	29	4.2×10^4	1.6×10^4
	42	3.6×10^6	1.9×10^6

ZoBell: ZoBell's 2216e agar, BTB: BTB teepol agar.

* Feeding regimens of each group were shown in Fig. 4-1.

細菌数が漸増していたが、一般細菌数は $1.9 \sim 2.0 \times 10^3$ CFU/尾とほとんど変わらなかった。その後、この冷凍区的一般細菌数およびB T B細菌数は29日齢に $3.0 \times$

10^4 CFU/尾あるいは 9.6×10^3 CFU/尾まで増加した後、冷凍B Sと配合飼料のみの投与となった42日齢にはむしろ減少して、 5.3×10^2 CFU/尾および 2.3×10^2 CFU/尾になった。一方、無処理区では、一般細菌数およびB T B細菌数とも15日齢以後も増加を続け、42日齢には他の2区よりも3~4桁多い 3.6×10^6 CFU/尾あるいは 1.9×10^6 CFU/尾にまでそれぞれ達したが、この間特に異常な斃死や衰弱魚は全く観察されなかった。

Table 4-2. Bacterial flora (%) of larvae and juveniles of black seabream with different feeding regimens

Pond*	Fish age Day-old	V-I	V-II (+)	V-II (-)	V-III	Ps	Al	UI
I	10		33		29	33		5
	15	10	10		21	55		3
	22					100		
	29	28	5		30	21		16
	42			28		53		19
	Mean	8	10	6	16	53		9
II	10		77		12	12		
	15	12	62			27		
	22		56			13	6	25
	29	21		63	13			4
	42		29			62		10
	Mean	7	45	13	5	23	1	8
III	10		16		85			
	15	38	63					
	22		30			65	6	
	29	18	9		8	39		27
	42	14		86				
	Mean	14	23	17	18	21	1	5

V-I: *Vibrio* spp.-I, V-II (+): *Vibrio* spp.-II (swarming positive), V-II(-): *Vibrio* spp.-II (swarming negative), V-III: *Vibrio* spp.-III, Ps: *Pseudomonas* Group III, IV, Al: *Alcaligenes*, UI: Unidentified.
* Feeding regimens of each group were given in Fig.4-1.

次に、これらの各調査時における一般細菌の組成変化をTable 4-2に示した。なお、ここではMuroga *et al.*²⁸⁾が*Vibrio* spp. - IIとした菌群を、スワーミング能の有無によってさらに(+)と(-)とに分けて示した。それによると、NFS区では10日齢*Vibrio* spp. - II (+)とIII, および*Pseudomonas* Group III, IV (以下*Pseudomonas* とのみ記す)の3菌群が30%前後ずつほぼ同じ割合で存在していたが、15日齢には*Pseudomonas*が優占して過半以上となり、さらに22日齢にはほぼ100%を占めるに至った。しかし、29日齢には、また先の3菌群がほぼ拮抗した後、42日齢には再度*Pseudomonas*が53%を占めており、総じて*Pseudomonas*が優占菌であることが多かった。

冷凍区では、22日齢まで3回の調査時、77, 62, 次いで56%と漸減してはいたが、*Vibrio* spp. - II (+)が優占し続けていた。しかし、その後は、29日齢に*Vibrio* spp. - II (-)が、42日齢に*Pseudomonas*がそれぞれ63あるいは62%を占めていた。

無処理区では、概して他の2区以上に組成の変動が大

Table 4-3. Bacterial counts and flora of diets for black seabream (May, 1989)

Diet	Treatment	Storage period (days)	Bacterial count (CFU/g)		Flora(%)						
			ZoBell	BTB	V-II (+)	V-II (-)	V-III	Ps	M	Al	UI
Rotifer	Treated with NFS	0	1.4×10^6	1.1×10^6	0	0	0	46	44	0	11
	Frozen	58	5.7×10^6	1.1×10^5	39	0	0	59	0	0	3
	Not treated	0	2.0×10^8	2.4×10^8	31	6	0	46	0	0	17
Brine shrimp	Treated with NFS	0	1.3×10^8	1.1×10^7	3	0	0	84	8	0	5
	Frozen	63	2.3×10^7	7.9×10^6	26	0	0	37	0	0	37
	Not treated	0	1.2×10^8	4.8×10^7	4	0	0	83	0	0	13
	Not treated	0	1.2×10^8	4.4×10^7	1	0	18	57	0	0	24
Floating egg of black seabream	Frozen	40	1.0×10^5	1.9×10^4	0	0	0	0	61	30	9
	Not treated	0	5.6×10^6	2.3×10^6	0	19	0	21	0	26	35

ZoBell: ZoBell's 2216e agar, BTB: BTB teepol agar, V-II(+): *Vibrio* spp.-II (swarming positive), V-II(-): *Vibrio* spp.-II (swarming negative), V-III: *Vibrio* spp.-III, Ps: *Pseudomonas* Group III, IV, M: *Moraxella*, Al: *Alcaligenes*, UI: Unidentified,

きかった。すなわち、10、15、22、29、および42日齢の各調査時に *Vibrio* spp.-III (85%), *Vibrio* spp.-II (+) (63%), *Pseudomonas* (65%), *Pseudomonas* (39%), *Vibrio* spp.-II (-) (86%) と優占菌が大きく変化していた。

今回の調査を通じて試験区ごとに各菌群の出現率を平均してみると、NFS区では53%を *Pseudomonas* が占め、*Vibrio* は合わせて40%であった。一方、冷凍区と無処理区は比較的良く似た組成で、69~73%の *Vibrio* と21~23%の *Pseudomonas* によってその大半が占められていた。

餌料の細菌叢 配合飼料を除いて、本飼育試験でクロダイ仔稚魚に投与した餌料の細菌数と細菌叢を Table 4-3 に示した。それによると、NFSワムシの一般細菌数は 1.4×10^6 CFU/g であった。その組成をみると *Pseudomonas* と *Moraxella* がほぼ同じ割合で存在し、合わせて90%以上を占めていた。冷凍ワムシでは 5.7×10^6 CFU/g の一般細菌の内、59%を *Pseudomonas* が、次いで39%を *Vibrio* spp.-II (+) がそれぞれ占めていた。無処理ワムシの細菌組成は冷凍ワムシのそれと大差なかったが、細菌数は 2.0×10^8 CFU/g と2桁高かった。

NFS-B Sでも一般細菌数は 1.3×10^8 CFU/g に達していたが、その大半は *Pseudomonas* によって占められていた。一方、冷凍B Sの一般細菌数はやや少なく、 2.3×10^7 CFU/g であった。その組成をみると、同定不能な菌株もやや多かったが、それを除けば *Pseudomonas* と *Vibrio* spp.-II (+) が優占していた。無処理B Sの一般細菌数は2回の調査とも 1.2×10^8 CFU/g に達し、いずれの組成をみても、数値に差はあるものの、ともに *Pseudomonas* が優占していた。

クロダイ浮上卵の保有する一般細菌数は、ワムシやB Sに比べて少なく、生で 5.6×10^6 CFU/g、冷凍保存したものは 1.0×10^5 CFU/g しかなかった。組成にもやや特徴があり、ともに26~30%を *Alcaligenes* が占めていた。生の卵では、この *Alcaligenes* に次いで *Pseudomonas* が21%を占めていたが、冷凍卵では61%を *Moraxella* が占めていた。

成長 各区のクロダイ仔稚魚の成長(全長)を Fig. 4-2 に、また飼育期間中に投与した飼餌料の総量を Table 4-4 にそれぞれ示した。Fig. 4-2 に示したように、22日齢以後は冷凍区の成長がもっとも劣り、無処理区が逆に優れていた。また、その傾向は取り上げまで変わらなかった。取り上げ時の各試験区における稚魚の平均全長は、NFS

区が16.5mm、冷凍区が14.0mm、無処理区が17.6mmであった。一方、Table 4-4により、飼育期間中に投与されたワムシの量を比べると、NFS区と無処理区ではほとんど差はなく、それぞれ55.6および59.3億個体であった。冷凍区ではそのほぼ1/3の17.9億個体しか投与されなかったが、冷凍ワムシが8,500 g (約42億個体に相当)

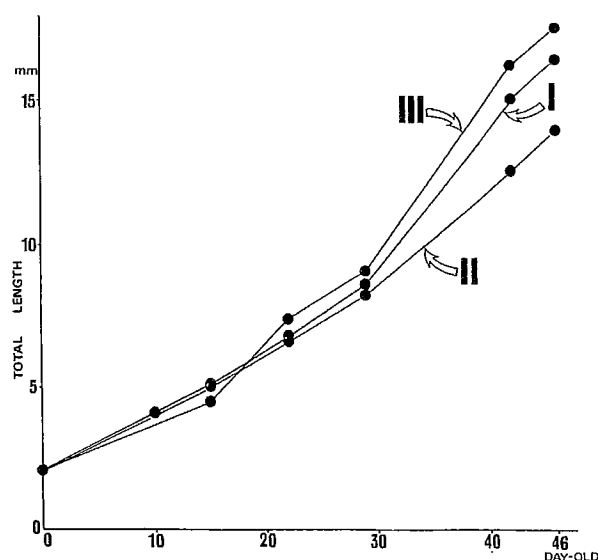


Fig. 4-2. Comparison in growth of black seabream with different diets.

Pond I: Live diets (rotifer and brine shrimp) treated with sodium nifurstyrenate (NFS) were given.

Pond II: Frozen diets (rotifer and brine shrimp) were given from 17th day post-hatching on.

Pond III: Live diets without NFS treatment were given.

Table 4-4. Total amounts of live and artificial diets given to larvae and juveniles of black seabream in the experiment with different feeding

Diet	Pond*			
	I	II	III	
Rotifer	Live ($\times 10^8$ individuals)	55.6	17.9	59.3
	Frozen ($\times 10^3$ g)		8.5	
Brine shrimp	Live ($\times 10^8$ indi.)	34.3		65.1
	Frozen ($\times 10^3$ g)		16.0	
Floating egg	Live ($\times 10^8$ indi.)	106.1		
	Frozen ($\times 10^3$ g)	65.4		
Artificial diet (g)	7120	8235	7935	

* Feeding regimens of each group were given in Fig. 4-1.

与えられていた。B Sは、無処理区では65.1千万個体投与されていたが、NFS区では投与期間が短いこともあって34.3千万個体と約半分、また冷凍区には冷凍B Sが16,000 g (約8億個体)それぞれ給餌されていた。

生残および活力 各試験区の最終的な生残率を比較してTable 4-5に示した。そこに示したように、冷凍区の生残率が73.1%ともっとも優れていた。

また、各試験区とも22日齢において調べた100尾すべてに鰓が観察され、開腔率はいずれも100%であった。

取上げた時に稚魚に対して行った活力試験の結果をTable 4-6に示した。その結果、いずれの試験区においても活力の指標となる生残率は97.0~97.7%の範囲となり、それら活力指標値の間に有意な差は認められなかった。

考 察

ワムシやB Sを含めた餌料の細菌叢と、それを投与された仔稚魚の特に消化管内細菌叢との間に深い関連があることが従来から推測されていた。しかし、魚類仔稚魚の体長が一般に数mmと小さく、組織も脆弱で扱いにくいこと等から、これらの相互関係に関する細菌学的検討は永く不十分なままであった。

ところが、0.1%塩化ベンザルコニウム液を用いたマ

Table 4-5. Survival rate of black seabream cultured with different diets

Pond	live diet treatment	Number of fish	
		surviing / hatching($\times 10^3$)	%
I	NFS-treated	288 / 710	40.6
II	frozen	519 / 710	73.1
III	not treated	184 / 710	25.9

NFS : sodium nifurstyrenate

Table 4-6. Comparison in suffocation tolerance (handling) of black seabream juveniles cultured with different diets

Pond	Live diet treatment	Number of fish	
		Surviving / Tested	%
I	NFS-treated	1167 / 1203	97.0
II	Frozen	1300 / 1333	97.5
III	Not treated	778 / 796	97.7

NFS : Sodium nifurstyrenate

ダイおよびクロダイ仔稚魚の消化管内細菌叢の定量的な分離方法がMuroga *et al.*²⁹⁾によって開発され、ヒラメ⁵⁹⁾やクロソイ*Sebastes schlegeli*, トラフグ*Takifugu rubripes*あるいはキジハタ*Epinephelus akaara*仔稚魚⁶⁰⁾について調べられた。さらに、それを応用して疾病発生時のマダイ消化管内細菌叢の検討が安信ら⁶¹⁾によってなされ、今ではいくつかの興味深い知見が得られている。

それによると、例えば18~46日齢のマダイでは仔魚1尾当たりの一般細菌数は $1.6 \times 10^4 \sim 1.1 \times 10^5$ CFU、18~32日齢のクロダイでは $2.6 \sim 3.7 \times 10^4$ CFUとされ、また腹部(腸管)膨満症発生時のマダイにおいては発症前に 10^3 CFU/尾であった一般細菌数が、発症後には 10^6 CFU/尾に著しく増加していたとされている。また、その正常細菌叢をみると、*Vibrio*がマダイで47.2%、クロダイで43.1%を占め、次いで*Pseudomonas*が両魚種とも30%前後を占めていたとMuroga *et al.*²⁹⁾が述べている。安信ら⁶¹⁾も、正常なマダイでは47.2~59.6%の*Vibrio*と15.9~29.6%の*Pseudomonas*を報告しており、消化管内細菌叢について、両報告とも*Vibrio*とそれに次ぐ*Pseudomonas*を主たる構成菌としている点が共通している。

これらの報告と、今回著者らによって得られた結果を比較すると、NFS区の組成こそやや異なりはしたものの、その他の菌数や組成は総じて彼らの報告に近いものであり、種苗生産方法にかかわらず、人工種苗生産されたタイ類仔稚魚にはほぼ共通した値であるかもしれない。また、NFS区においては*Vibrio*の割合が他の2区よりも低かったが、Tanasomwang and Muroga⁶⁰⁾はNFSワムシを投与されたクロソイ仔稚魚の消化管内細菌叢において*Vibrio*の顕著な減少を観察しており、今回と良く似た現象として興味深い。

ところで、種苗生産現場では、その経験的な効果、あるいは*Vibrio*に対する比較的強い選択的殺菌効果³⁴⁾を根拠として、餌料生物へのNFS浴がなされている。しかし、このような使用法は薬剤使用基準に合致しないこと⁶²⁾、また誤った使用法は耐性菌の出現を招きやすいこと⁶³⁾等から、それが比較的広く使われる現状には少なからず問題があるとも考えられる^{64, 65)}。

一方、一部の種苗生産機関では種苗生産期の省力化を図ったり、培養水槽の不足を補うため、ワムシやB Sの冷凍保存をいわゆる端境期に行い、春または秋季の魚介類種苗の生産に用いることがある。今回、NFS浴と同等に細菌汚染が軽減されているこの冷凍保存餌料を種苗生

産に積極的に用いた結果、飼育作業の労力的負担が軽くなっただけでなく、無処理餌料を与えた場合はもちろん、NFS浴の場合と比べてもはるかに良好な生残率と取り上げ密度が得られたことは大きな意味があると考えられた。事実、その後、この報告等を参考にして、ヒラメ種苗生産に冷凍したワムシとBS幼生を使用して比較的良好的な成績を得た例⁶⁶もあり、冷凍餌料を活用する方法の応用範囲は広いと考えられた。

ところで、生残率には3倍もの差が生じていた冷凍区と無処理区とにおいて、平均値でみた仔稚魚の消化管内細菌叢にはほとんど差はなかった事実は興味深い。安信ら⁶¹は、腹部(腸管)膨満症のマダイについていずれの発症時にも共通する特定の優占菌はなかったとしているが、*Vibrio*が90%以上を占めていた事実と合わせて、菌数が3桁程度も高かったことを特徴として指摘している。今回の無処理区においては疾病の発生はみられず、仔魚の活力も劣ってはいなかったが、他の2区に比べて菌数が高く推移していたことが、腹部(腸管)膨満症魚とやや似ていた。また、組成の変化を詳しくみると、先にも述べたように優占菌の変化の幅が比較的大きいことも特徴としてあげられた。これは、単に餌料中の菌数の高低だけでなく、1~2回の培養と収穫で種苗生産期間中の全必要量を作製し保存しておくことが可能な冷凍餌料に比べれば、毎日必要量を収穫する無処理区の餌料生物の細菌叢変化が比較的大きいと推測され、そのことがその餌料を投与された仔稚魚細菌叢変化にも反映されていると考えることができる。Sera and Ishida⁶⁷ および瀬良・石田⁶⁸は、成魚になっても胃が未発達で、消化管内の物理的、化学的条件が細菌を淘汰するほどには厳しくないカワハギ*Stephanolepis cirrhifer*では餌料中の細菌叢がほとんどそのまま腸内細菌叢に反映されると述べており、消化管の発達が不十分なクロダイ仔稚魚においても同様な現象が起きているのかもしれない。また、ヒトにおいては宿主が健康である限り腸内細菌叢には一定の均衡が保たれているが、病的状態ではその均衡が破られること、しかし細菌叢の変動が感染の前提なのか結果であるのかは明らかではないことなどを、坂崎⁶⁹が指摘している。人工生産仔稚魚においても、消化管内細菌叢が、餌料生物に起因して頻繁に、かつ大きく変化することが結果として何等かの形で仔稚魚に悪影響を与えている可能性が考えられたが、詳細はさらに検討の必要があろう。

一方、無処理区で成長が比較的良好であったのは、生残率の低下に伴う飼育密度の減少によるものと推定され

るが、厳密には投与餌料の総熱量等をそろえた試験を待たねばならない。

2. アユ仔稚魚の消化管内細菌叢に及ぼす餌料生物の二フルスチレン酸ナトリウム浴と冷凍保存の影響

ここでは、クロダイに比べふ化時にはるかに発生が進んでおり、活発に遊泳、摂餌し、かつ生産期間を通じて終始異常斃死例が知られているアユを用いて、ふ化の翌日から直ちに冷凍餌料生物を投与した場合の生残や消化管内細菌叢等を調査した。また、冷凍処理することなくNFS浴のみを施した餌料生物を投与した試験区も設定し、比較に供した。

材料および方法

ワムシとBSの培養およびその処理 当センターの屋内40klコンクリート水槽を用い、別に屋外で自家培養した*N. oculata*と市販のパン酵母、油脂酵母を与えて、20~24℃の水温下で培養したワムシ(S型)を使用した。収穫の最低2日前からは油脂酵母のみを与えた。原則として培養水は全海水としたが、増殖率が低下したときは適宜水道水で薄めて比重を下げた。こうして大量培養したワムシに対して以下の処理を加えて飼育試験に供した。

- ①毎日必要量(約1億個体)を前記の培養槽から収穫し、約5mg/lの濃度にNSを加えた*N. oculata*培養水200lに収容して3~6時間薬浴することにより2次培養を行い、これをNFSワムシとした。
- ②1989年9月5日と11日にそれぞれ1培養水槽のほぼすべてのワムシを収穫し、十分に水分を除いた後、200または500gずつ小分けして、-30℃で冷凍した。後述するように、50日以上冷凍保存した後10月24日からアユ仔稚魚に投与した。
- ③特別な処理を一切行わず、*N. oculata*培養水に①と同じ時間だけ収容して2次培養した後に投与した。これを無処理ワムシとした。

BSについては以下の処理を加えた。500gの中国産耐久卵(日配くるまえび)を、27~28℃の海水200lに収容して強く通気し、48時間後にノープリウスを分離、収穫した。次いで、これを2分して、乳化油脂であるエステル85(日清製油)を0.1ml/l含む新たな海水150lを満たした2つの水槽にそれぞれ移した。NFSを約5mg/lとなるように一方にのみ添加し、これをNFS-B Sとした。残る一方を無処理BSとし、ともに7時間後に収穫、アユにそれぞれ投与した。また、この無処理B

Sとはほぼ同じ方法で9月27日と10月4日の2回、BSをふ化させ、収穫した幼生をそれぞれ500gずつ小分けして冷凍し、これを冷凍BSとした。

飼育の概略と試験区の設定 10月12日、木曾川産の天然親魚（雌81尾、雄20尾）を用いて乾導法により得た受精卵を、19℃前後の淡水中で管理した。その後、当センターの屋内30kl八角型コンクリート水槽3面に、淡水を10klずつ用意し、ふ化数日前の発眼卵を均等にそれぞれ収容した。10月23日にほぼすべての卵がふ化した。別にとった卵およびふ化仔魚からふ化率と各池の収容ふ化仔魚数を推定したところ、それぞれ57.6%と22.4万尾と求められた。ふ化終了後、直ちに海水を注入して、容量を20klとし、以後は1回転/日程度の微流水とした。成長にともない、31日齢からは水位を上げて、30klとした。注水量を徐々に増加させたが、回転率は最高時でも3回転/日程度であった。37日齢からは、熱交換機を用いて飼育水を加温した。池による水温の違いはほとんどなかった。5日ごとの平均飼育水温の変化と餌料系列をFig. 4-3に示した。1日齢から37日齢までワムシを、31日齢から58日齢までBSを、5日齢から取り上げの前日である79日齢まで配合飼料として協和A-1、B-1（協和発酵）、およびたい種苗生産用飼料前期3号（日清製粉）をそれぞれ与えた。試験区として次の3区を設け1池ずつをあて、いずれも80日齢（1990年1月11日）まで飼育を続けた。

I. NFS区 ワムシおよびBSともすべて必ずNFS

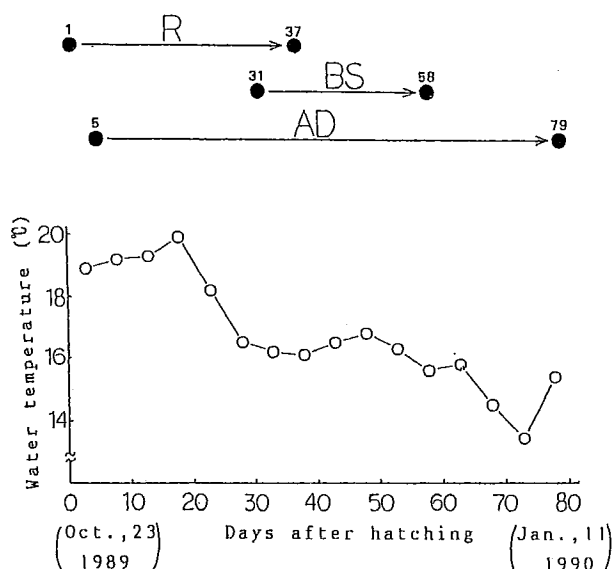


Fig.4-3. Feeding regimen and rearing water temperature for ayu. R: Rotifer, BS: Brine shrimp, AD: Artificial diet.

浴した後に、アユに投与した。

II. 冷凍区 ワムシ及びBSとしてはいずれも冷凍したもののみを与えた。

III. 無処理区 対照。

細菌叢調査 タイ類の消化管内細菌叢調査のために開発された方法が、アユ仔稚魚に対しても応用可能であることを予備実験により確認した後、その分離方法および簡易鑑別法²⁹⁾を本調査に用いた。すなわち、体表を0.1%塩化ベンザルコニウム液で1分ずつ2回殺菌処理した30尾のアユ仔魚を、洗浄後に滅菌海水とともにガラスホモジナイザーで磨砕し、滅菌海水にて希釈した後ZoBell's 2216e寒天培地に接種した。25℃で2日間培養することにより仔魚の消化管内細菌数を求めた。次いで、生育したコロニーを肉眼的に分別し、それぞれ代表的なコロニーを釣菌して純培養した後、運動性やオキシダーゼ産生能の有無等の生理化学的性状を基準とした簡易鑑別法によりそれらを分類して組成を明らかにした。この簡易鑑別法は、アルギニン分解能およびリジン脱炭酸能の有無の組み合わせ(+, -, --)により、仔稚魚の生残等に深く関与していると思われる*Vibrio*をI~IIIの3グループに分けているが、ここではこのIIをさらにスワーミング能の有無でII (+)とII (-)に分けて適用した。10, 20, 30, 40, 49, 64, および77日齢の仔稚魚を、各飼育池の表層からすくいとり本調査に供試した。餌料についてもそれぞれ細菌叢調査を行い、比較検討した。

成長と生残率 上述の調査日に、細菌叢調査とは別に各水槽から50尾ずつの仔稚魚をとり、全長を計測した。また、実験終了日（80日齢）には、生残魚のすべてを取り上げて、いわゆる重量法により計数し、生残率を求めた。この時に、無作為に各100尾の全長を測定した。

結 果

各試験区におけるアユ仔稚魚の消化管内細菌数と細菌叢の変化を、平均全長の変化とともにTable 4-7に示した。アユ仔魚1尾当たりの細菌数は10日齢から20日齢にかけて急増し、いずれの試験区においても $10^2 \sim 10^3$ CFUに達した。その後、NFS区では 10^3 CFU/尾で推移した後、配合飼料の単独給餌となった64および77日齢にかけて再び増加し、 5.1×10^4 CFU/尾に達した。冷凍区では、一度は増加した菌数が49日齢には減少し、その後、増減を繰り返した。無処理区では、64日齢まで 10^4 CFU/尾で安定していたが、77日齢にはやや増えて 2.5×10^5 CFU/尾に達した。3区の細菌数を平均値で

比較すると、冷凍区がもっとも少なく、無処理区がもっとも多かった。その組成の変化は極めて複雑で、いずれの試験区の、どの菌群の割合も増減を繰り返していたが、

最終的な平均値をみると、*Pseudomonas*の割合が、NFS区、冷凍区、無処理区の順に低下していた。一方、*Vibrio*の割合を4菌群の合計で比較すると、NFS区と冷

Table 4-7. Effects of diets (NFS-treated, frozen and control diets) on bacterial counts and flora of ayu at different ages

Group (Treatment of diets)	Fish age (Day-old)	TL±SD (mm)	Bacterial count (CFU/fish)	Flora (%)							
				V- I	V- II (+)	V- II (-)	V- III	Ps	Al	UI	
I Sodium nifurstyrenate-treated	10	11.09±0.42	1.4×10						88.2		11.8
	20	12.91±0.84	1.2×10 ³	1.4				93.7			4.9
	30	15.96±1.20	1.8×10 ³	95.9							4.1
	40	22.47±1.71	7.4×10 ³	7.9					66.3		12.3
	49	28.31±2.39	5.5×10 ³	5.4				62.4	14.0		18.2
	64	33.52±3.03	8.5×10 ³	64.5				29.0			6.5
	77	39.72±4.22	5.1×10 ⁴	26.7					59.4		13.9
	Mean			1.1×10 ⁴	28.8			26.4	32.6		10.2
II Frozen diets	10	8.66±0.55	3.3×10						7.7	84.6	7.7
	20	11.70±0.97	9.7×10 ²	15.5				71.6	6.0		6.9
	30	13.13±1.26	5.2×10 ²			6.5	30.6	46.8			16.1
	40	15.66±2.75	3.2×10 ³	31.6				55.3			13.1
	49	19.72±4.51	9.7×10 ²	12.1		25.9	13.8	37.9			10.3
	64	32.49±3.36	2.0×10 ⁴	74.6				15.3	8.5		1.6
	77	41.91±3.80	7.6×10 ³	57.6		35.8					6.6
	Mean			4.8×10 ³	27.3	9.7	18.8	23.2			8.8
III Not treated (control)	10	10.81±0.51	1.9×10						26.1	52.2	21.7
	20	13.03±0.78	4.2×10 ²					92.0	4.0		4.0
	30	15.83±1.47	6.4×10 ³					100.0			
	40	23.03±1.24	4.0×10 ⁴	12.5	25.0					20.8	41.7
	49	27.88±1.81	1.4×10 ⁴	5.6	5.6			47.2	36.1		5.5
	64	32.27±2.70	3.7×10 ⁴	89.1					4.5		6.4
	77	38.46±4.17	2.5×10 ⁵	10.2				87.8			2.0
	Mean			5.0×10 ⁴	16.8	4.4		46.7	10.1	10.4	11.6

TL±SD: Total length and standard deviation, V- I : *Vibrio* spp.- I , V- II (+): *Vibrio* spp.- II (swarming positive), V- II (-): *Vibrio* spp.- II (swarming negative), V- III : *Vibrio* spp.- III, Ps: *Pseudomonas* Group III, IV, Al: *Alcaligenes*, UI: unidentified.

Table 4-8. Bacterial counts and flora of feeds for ayu used in the experiment (Table 4-7)

Diets	Sampling date (1989)	Treatment	Bacterial count (CFU/g)	Flora (%)								
				V- I	V- II	V- III	P- I, II	P- III, IV	Mo	Ac	Al	UI
Rotifer	Nov.,2	Treated with NFS	1.4×10 ⁷						77.9	21.2		0.9
		Frozen (for 58days)	2.6×10 ⁶						100.0			
		Not treated	2.3×10 ⁷			12.5				87.5		
Rotifer	Nov.,22	Treated with NFS	7.3×10 ⁷	48.1						20.3	31.6	
		Frozen (for 72days)	1.3×10 ⁶						79.9	12.9		7.2
		Not treated	3.4×10 ⁸	64.2					18.8		8.5	8.4
Brine shrimp	Dec.,4	Treated with NFS	1.7×10 ⁸						100.0			
		Frozen (for 61days)	7.7×10 ⁶						100.0			
		Not treated	3.4×10 ⁸	31.8	11.4		9.1	36.4				11.3

V- I : *Vibrio* spp.- I , V- II : *Vibrio* spp.- II , V- III : *Vibrio* spp.- III, P- I II : *Pseudomonas* Group I , II, P- III, IV: *Pseudomonas* Group III, IV, Mo: *Moraxella*, Ac: *Acinetobacter*, Al: *Alcaligenes*, UI: unidentified.

凍区はそれぞれ55.2および55.8%とほとんど差はなかったが、無処理区の*Vibrio*の割合は合計で67.9%に達し、他の2区よりも高かった。それらの組成をみると、冷凍区でのみ*Vibrio* spp.-II (-)が、また無処理区でのみ*Vibrio* spp.-II (+)がそれぞれ検出され、NFS区では、*Vibrio* spp.-Iと*Vibrio* spp.-IIIのみが検出された。

調査回数は少ないが、餌料について行った細菌叢調査の結果をTable 4-8に示した。11月2日にアユに投与したNFSワムシ、冷凍ワムシ、および無処理ワムシはいずれもほとんど*Vibrio*を含まず、*Pseudomonas*や*Moraxella*が主体であったが、その次の調査における無処理ワムシの細菌叢は一変し*Vibrio*が64.2%を占めており、NFSワムシの細菌叢においてもほぼ半分が*Vibrio*となっていた。BSについてみると、NFS-BSおよび冷凍BSのいずれも*Pseudomonas*が100%を占めていたが、無処理BSでは*Vibrio*が合計で50%を越えていた。

飼育試験期間中の餌料の総投与量や生残率および取り上げ時の平均全長等をTable 4-9に示した。NFS区と無処理区の生残率はそれぞれ77.7および96.9%と良好で、餌料生物のほかにも合計25kg近い配合飼料がそれぞれに投与されていた。一方、生残尾数や残餌の量に応じて随時投与量を調節したこともあって、冷凍区への配合飼料の総投与量は10kgに足らず、試験終了時の生残率も24.6%と低く、成長も劣っていた。

考 察

冷凍区においては10日齢で早くも他の2区に比べて

Table 4-9. Growth of ayu and amount of diets administered in the experiment (Table 4-7)

Group	I	II	III
	NFS*1 treated	Frozen	Not treated
Live diet treatment			
Survived/hatched (10 ³)	174/224	55/224	217/224
%	77.7	24.6	96.9
TL*2 (mm) at 80 day-old	37.4*3 ± 6.20*4	31.9 ± 5.82	36.0 ± 5.45
Total amounts given			
Rotifer: Live (10 ⁸ individuals)	37.0	0	37.0
Erozen (10 ³ g)	0	14.6	0
Brine shrimp: Live (10 ⁷ indi.)	90.9	0	90.9
:Frozen (10 ³ g)	0	14.0	0
Artificial diet (g)	24910	9670	24910

*1 Sodium nifurstyrenate, *2 Total length, *3 Mean, *4 Standard deviation.

成長が劣っていたこと、目視観察によれば20日齢頃から60日齢あたりまで斃死が続いたこと、最終的な生残率が3区の中でもっとも低かったことなどからみて、アユ仔魚に対するふ化翌日からの冷凍餌料の投与は実用的ではないことがわかった。しかし、クロダイと同様に投与開始時期を遅らせる等の工夫を講じれば、アユの場合もまた今回と異なる結果が得られる可能性は残されている。

NFS区および無処理区の生残率がともに良好で、むしろ無処理区がわずかながら高かったこと等から、本結果をみる限るでは、餌料に対するNFS浴の意義は不明確であった。このことから、ある種の*Vibrio*による腸管感染症が発生するような場合はともかく、病気の危険性がない時のNFS浴には意味がないことが裏付けられたと言えよう。

ヒラメ仔稚魚について今回とほぼ同じ方法でその細菌叢を調査したTanasomwang and Muroga⁵⁹⁾は、飼育の後期、配合飼料の単独投与になると、それまで10⁵ CFU程度あった稚魚1尾当たりの菌数が1桁程度減少したと報告している。しかし、今回のアユにおける調査では、先のクロダイにおけるNFS区および無処理区での結果と同じく、配合飼料の単独投与になっても菌数の減少は観察されなかった。これはヒラメの場合と違って、アユおよびクロダイの場合は配合飼料の単独投与に移行する前の細菌数が10⁴ CFU/尾(対照区)と比較的低かったことによる違いと考えられる。

先のクロダイでの結果と、今回の結果とを比較すると、仔魚1尾当たりの菌数が無処理区、NFS区、冷凍区の順に、また、そこにおける*Pseudomonas*の割合はNFS区、冷凍区、無処理区の順にそれぞれ減少していること、さらに無処理区において*Vibrio*の割合がもっとも高いこと等の点で一致していたが、今回はNFS区にける*Pseudomonas*の割合が過半を占めていた点で異なっていた。また、Tanasomwang and Muroga⁶⁰⁾は、NFSワムシを投与したクロソイの消化管内細菌叢において*Vibrio*の顕著な減少を観察しているが、今回のアユ仔稚魚では菌数こそ1桁足らず低かったものの、菌叢をみると無処理区に比べてわずか13%程度*Vibrio*の割合が低かったに過ぎなかった。この差が魚種の違いに起因したものか、餌料の細菌叢の違いなど飼育条件の差によるものかは明らかではなかった。また、*Vibrio*がかなり減少していた冷凍餌料のみを与えていたアユの消化管内にも高い割合で各種の*Vibrio*が出現し、他の2区と比べてもその割合に著しい差がなかったことは、先のNFS薬浴の影響

についての実験結果とあわせ、それら *Vibrio* がアユ仔稚魚の消化管への親和性あるいは定着性を有していることを思わせる極めて興味深い現象と言えよう。

第V章

ワムシのNFS浴の効果持続時間と栄養強化剤の影響

ワムシにNFS浴を施すことで、ワムシの保有する *Vibrio* 菌数が減少すること、およびワムシなどの餌料生物にNFS浴を励行することで稚苗生産中のアユ仔魚の大量死発生率が著しく減少することを著者は既に明らかにした。

しかし薬浴の濃度や時間、手順等が生産機関によって様々なうえ、薬浴終了後、薬浴効果はどのくらい維持されるかについては未解明であった。また薬浴時に栄養強化処理を併わせて実施する場合が多く、栄養強化剤の種類が近年豊富になったこと、さらに高密度培養等の新しい方法がワムシ培養に導入されたことなどから、改めてこれらの影響について検討した。

材料および方法

ワムシ 当センターの屋内40kl角形コンクリート水槽で、*N. oculata* と市販の濃縮淡水クロレラ（商品名生クロレラV12、クロレラ工業）およびパン酵母を投与して、20～23℃の3/4～全海水で植え継ぎ（バッチ）法によって培養した広島県栽培漁業協会由来のいわゆるS型ワムシを材料とした。またクロレラ工業由来のSS型ワムシには濃縮淡水クロレラのみを与え、30℃の全海水で市販の培養装置（商品名ワムシわくわく、クロレラ工業）を用いて培養した。酸素供給装置、pH調整装置を使用せず、空気通気のみとし、新鮮海水の注水とクロレラの給餌をそれぞれ毎時1回として、換水率0.5回転/日となるよう条件を設定した。

プランクトンネット（オープニング42μm）を用いてワムシを収穫し、新鮮な濾過海水で洗浄した後、約1万個体/mlの密度になるよう濾過海水に再浮遊させ供試材料とした。

細菌検査 B T B ティポール寒天培地のかわりにTCBS寒天培地（栄研）を使用したほかは既述の方法に従い、TCBS寒天培地によって得られた菌数をTCBS細菌数とした。

実験1 約200個体/mlの密度まで順調に増殖した平均体重2.0μg/個体（湿重量）のS型ワムシを材料とした。有効濃度が5mg/lになるようNFSをワムシ浮遊液に加えて、弱い通気を行いながら25℃のインキュ

ベーター内に3時間おいた。薬浴終了後ワムシを収穫し、濾過海水で洗浄し、新たな濾過海水に再浮遊させた。薬浴前と、薬浴直後、薬浴終了1、3および6時間後に上記の細菌検査を行い、薬浴処理終了後の菌数変化を調べた。さらにNFSを添加しない試験区を設け、これを対照区とした。

実験2 平均体重1.6μg/個体（湿重量）のSS型ワムシを材料とした。ワムシの培養密度は約1,500個体/mlであった。薬浴の条件は実験1と同じとした。薬浴終了2時間後と、1夜おいた17時間後に細菌検査を実施した。NFSを添加せずに同様の操作を行った試験区を対照区とした。

実験3 乳化油脂型（商品名ドコサ65E、秋田十條化成）、冷凍酵母型（商品名油脂酵母レッド、協和醗酵）、冷凍植物プランクトン型（商品名マリクロレラ100、マリンバイオ）の3種類の栄養強化剤を供試して、薬浴に及ぼす栄養強化剤の影響を検討した。NFS濃度、水温等は実験1と同じとしたが、栄養強化剤の添加濃度は各々1.0ml/l、1.0g/l、10.0ml/lとし、薬浴開始前と、薬浴3時間後、同5時間後に細菌検査を実施した。栄養強化剤を加えずNFSのみを添加した区（対照A）、および栄養強化剤もNFSも加えない区（対照B）をともに対照とし、NFSとそれぞれの栄養強化剤を添加した3区を試験区とした。

結 果

実験1 NFS浴がS型ワムシの細菌数に及ぼす影響をTable 5-1に示した。表に示されたように、対照区および薬浴区のいずれにおいても一般細菌数は試験開始から薬浴終了3時間後まで 3.6×10^8 から 1.4×10^9 CFU/gの範囲で推移しほとんど変化しなかったが、薬浴区でのみ6時間後に1桁増加していた。対照区のTCBS細菌数は3時間後まで 10^6 CFU/gのレベルでほぼ変化はなかつ

Table 5-1. Changes in bacterial count of rotifer (S type) after sodium nifurstyrenate (NFS) bath (5mg/l) for 3h

	ZoBell 2216e agar*		TCBS agar*	
	Control	Tested	Control	Tested
Before NFS bath	9.6×10^8	9.6×10^8	3.2×10^6	3.2×10^6
0h after NFS bath	7.5×10^8	5.5×10^8	4.9×10^6	1.1×10^5
1h	1.8×10^9	6.0×10^8	6.3×10^6	2.0×10^5
3h	1.4×10^9	3.6×10^8	6.0×10^6	2.5×10^4
6h	1.9×10^9	3.5×10^9	2.5×10^7	7.3×10^7

* CFU/g.

たが、6時間後には1桁増加した。一方、NFS浴により 10^6 CFU/gから 10^5 CFU/gまで1桁減少した試験区のTCBS細菌数は、薬浴終了3時間後にはさらに減少して 10^4 CFU/gになったものの、6時間後には 10^7 CFU/gまで3桁も増加した。

実験2 連続培養したSS型ワムシの細菌数に及ぼすNFSの影響をTable 5-2に示した。SS型ワムシの薬浴前の一般細菌数およびTCBS細菌数は 10^7 から 10^8 CFU/gでS型ワムシのそれと大差なかった。培地上でスワーミングする細菌の出現により一夜おいた対照区的一般細菌数を求めることができなかつたものの、対照区的一般細菌数には時間経過による変化がほとんどなかった。TCBS細菌数は当初わずかに減少した後、増加に転じ、翌日には実験開始時よりも1桁増加していた。薬浴区的一般細菌数はNFS浴によってわずかに減少し、2時間

Table 5-2. Changes in bacterial count of rotifer (SS type) after sodium nifurstyrenate (NFS) bath (5mg/l) for 3h

	ZoBell 2216e agar* ¹		TCBS agar* ¹	
	Control	Tested	Control	Tested
Before NFS bath	7.4×10^8	7.4×10^8	3.5×10^7	3.5×10^7
0h after NFS bath	5.3×10^8	1.1×10^8	6.5×10^6	3.3×10^4
2h	3.4×10^8	4.9×10^7	1.1×10^7	8.5×10^3
17h	ND* ²	9.2×10^8	1.4×10^8	5.0×10^7

*¹ CFU/g,

*² Not detected.

Table 5-3. Effects of nutritional additives on sodium nifurstyrenate (NFS) bath (5mg/l) of rotifer (S type)

Period of bath	Bacterial count: ZoBell 2216e agar*				
	Control		Tested (NFS+additives)		
	A**	B	D	M	Y
0h	5.5×10^8	5.5×10^8	5.5×10^8	5.5×10^8	5.5×10^8
3h	1.1×10^8	—	6.0×10^7	4.5×10^7	1.2×10^8
5h	6.3×10^7	9.8×10^8	2.5×10^7	2.5×10^7	4.9×10^7

	Bacterial count: TCBS agar*				
	Control		Tested (NFS + additives)		
	A	B	D	M	Y
0h	3.2×10^7	3.2×10^7	3.2×10^7	3.2×10^7	3.2×10^7
3h	3.8×10^3	—	9.2×10^5	1.3×10^5	7.5×10^5
5h	6.8×10^4	7.0×10^7	1.2×10^5	1.5×10^4	5.2×10^4

* CFU/g

** A: sodium nifurstyrenate (5mg/l), B: not treated,

D: "dokosa 65e" (1.0ml/l), M: "marine chlorella 100" (10.0ml/l),

Y: "yusi koubo red" (1.0g/l).

後も 10^7 CFU/gレベルを維持していたが、17時間後には薬浴前のレベルにまで戻っていた。一方、NFS浴によるTCBS細菌数の減少は極めて大きく3桁に達し、 10^4 CFU/gにまで減少して2時間後もその効果が持続していたが、実験1と同じく翌日にはその効果は認められなかった。

実験3 NFS浴に及ぼす栄養強化剤の影響をTable 5-3に示した。薬浴前に 5.5×10^8 CFU/gあった一般細菌数は、対照B区においてやや増加したものの、他の4区では暫減し、5時間後にはほぼ1桁減少していた。一方、当初に 3.2×10^7 CFU/gであったTCBS細菌数は、薬浴開始3時間後には対照A区で 10^{-4} も減少して 10^3 CFU/gレベルとなり、同5時間後にやや増加したものの 10^4 CFU/gレベルを維持していた。栄養強化剤を添加した3区のTCBS細菌数は、3時間後に 10^5 CFU/gレベルで、対照A区の 10^3 CFU/gに比べて多かったが、5時間後にはいずれも $10^4 \sim 10^5$ CFU/gとなりほぼ差はなくなった。

なおS型ワムシから得られたTCBS細菌については無作為に別途20株を選んで簡易鑑別⁷⁰⁾に供したところ、すべての菌株がグルコースを発酵的に分解する運動性のグラム陰性菌で好塩性を有していたことなどから、いずれも*Vibrio*属細菌と同定された。

考 察

種苗生産中の魚介類仔稚に大量死を発生させるおそれのある*Vibrio*属細菌としては、アユにおける*V. anguillarum*^{26, 27)}、ヒラメにおける*V. ichthyenteri*^{39, 41)}、マダイやクロダイにおける*V. alginolyticus*^{56, 57, 61)}、ガザミにおける*Vibrio* sp.^{71, 72)}などがあり、いずれも感染経路としてワムシなどの餌料生物が疑われている。なお、ワムシではなく藻類にて飼育中のトリガイ幼生⁷³⁾あるいはマガキ幼生^{74, 75)}にもビブリオ病は発生している。

疾病発生時、投与されていたワムシから上述の病原菌が実際に検出された例は少ないが²⁶⁾、第I章で示したように餌料生物にNFS浴を励行することで、現場ではアユの大量死が半減している。また、ヒラメでも腸管白濁症がやはり半減することが近年になって知られている^{*1)}。前回の試験から10年あまりが経過し、恐らく細菌叢も違っていたと思われるワムシを使用した今回の実験でも、NFS薬浴の*Vibrio*属細菌に対する抑制効果が改めて確認された。

*1 平成9年度ヒラメの細菌性腸管白濁症アンケートの結果、日本栽培漁業協会西日本支部(1997)。

しかし、NFS浴終了後6時間経過すると、薬浴前よりも細菌数がむしろ増加していたことは、現場におけるこの問題への対応の難しさを示している。種苗生産のごく初期においては、飼育水の換水率は低く、ワムシは飼育水中の密度が始終一定に維持されるように補充的に投与されるのが通常であり、投与後間もなく食い尽くされるわけではない。従って、NFS浴によって*Vibrio*細菌数を減少させたワムシを生産水槽に投与しても、そのワムシが仔魚に摂餌されるまでに相当な時間が経過してNFS浴の効果が消失している可能性があることが今回明らかになった。細菌数の増加自体は、薬浴をしていない対照区でも、その度合いは小さかったものの観察されており、飢餓状態によるワムシの生理活性の低下に主に起因しているものと推察される。従って、実際には困難かもしれないが、今回の実験結果からみればなるべくこまめにワムシの薬浴をし投与すべきであると考えられる。

実験1におけるTCBS細菌数の減少の度合いが、実験2および3に比べて小さかったのは、試験時の細菌叢にたまたま影響を受けたものと推察された。しかし、耐性菌出現の可能性も否定できないことから、活きたワムシに有効で、しかも薬剤を使わずに効果が長続きする*Vibrio*低減方法を今後は探索する必要がある。

SS型ワムシの細菌数は、別途実施した測定ではS型ワムシよりも1桁高かったが、ここでの差はほとんどなかった。しかし、酸素供給装置やpH調整装置を使用すると、SS型ワムシの密度は 10^4 個体/mlに達することが知られており⁷⁶⁾、そのような密度ではさらに異なった結果になることも考えられる³⁷⁾。

今回供試した栄養強化剤にはいずれもNFSに対する若干の阻害効果が観察されたものの、その度合いは低く、適切な濃度と時間が遵守されれば、NFS薬浴との併用は差し支えないものと判断された。

第VI章 とりまとめ

人の食品の場合、変敗の兆しとなる匂いの変化は、1g当たりの細菌数が魚肉で $10^{6.5} \sim 10^{6.6}$ 、カキで $10^4 \sim 10^{5.7}$ を越えると識別できるという⁷⁷⁾。とすれば、 10^9 CFU/gにも及ぶ細菌を保有しているワムシやBSなどの餌料生物はほとんど腐敗状態に匹敵するほどの細菌を保有していると言っても過言ではなく、これを連日飽食状態近くまで給餌している以上、それらの保有する細菌と摂餌した仔稚魚とが無関係でいられるはずがない。

種苗生産の現場では、「調子の悪いナンノを与えると

ワムシの調子が悪くなる」とか、「調子の悪いワムシを与えると魚の調子が悪くなる」といわれてきた。もちろん経験則をいっているのであって、さしたる科学的根拠があるわけではないが、著者自身、遊泳状態が不活発で増殖も不調のワムシをやむを得ず投与して数日の間に150万尾以上のキジハタ仔魚を死なせた苦い経験がある。NFSによる薬浴を励行していたが結果的にこの時は効果はなかった。

また、*V. ichthyoenteri*によるヒラメの腸管白濁症や*V. alginolyticus*等によるタイ類の腹部膨満症、前述のキジハタでの事例等のように急激な大量死を招いてはつきりと疾病と認識されるような場合だけでなく、飼育担当者が気づかないような緩慢な死亡率で結果として低生残率となることも少なくないと考えられる。

NFSによる薬浴は*Vibrio*の一部を減少させる効果はあるものの、*Vibrio*の組成によっては効果はなく、また他の細菌群に対しては無効と考えてよいこと、仔稚魚に有害でNFSに感受性を持たない細菌が存在する可能性は決して低くないことなどを飼育担当者は常に念頭においておく必要がある。しかしながら、ワムシを活かしたままで細菌数を減少させる方法がNFS浴以外に事実上ない以上、こうしたNFSの限界を認識したうえで上手に使うしか方法はない。

著者は折に触れ、餌料生物の細菌数を減少させる優れた方法がほかにないか模索を重ねてきた。具体的には、pH調整や酸素飽和度の影響、あるいはカテキンやシトラール、ヒノキチオール等の天然抗菌剤の応用や環境中の細菌の放出する抗*Vibrio*物質等を検討したが、いずれも実用的ではなかった。

薬剤を使用しない、微生物によるコントロール、いわゆるバイオコントロールが最近注目を集めている^{78, 79)}。我が国でも抗菌活性を有する魚類腸内細菌が分離されており^{80, 81)}、またタイ国のウシエビ*Penaeus monodon*種苗生産環境からは抗ビブリオ活性を示す細菌株がTanasomwang *et al.*により分離されている⁸²⁾。著者はこのTanasomwang *et al.* が分離した株のうち特に抗ビブリオ活性の高い株について、ワムシ中の細菌数に与える影響について検討してみた。しかし、ワムシ中の細菌数を減少させるような効果は認められず、むしろワムシそのものに対する毒性が認められる結果に終わってしまった。カキの幼生に発生するビブリオ病の防除対策に、*Vibrio*属細菌の増殖を抑制する細菌の利用も検討されている⁸³⁾。また、最近では藻類における魚病細菌に対する抗菌物質の産生⁸⁴⁾やファージを利用した魚類細菌性

疾病の制御⁸⁵⁾も試みられており、持続型養殖業が目標とされる昨今の状況では薬剤に替わるバイオコントロール法の模索に期待がかかっている。

また一方では、病原細菌を含む細菌の混入を防ぐため、ふ化直後から生物餌料を使わずに人工配合飼料に全面的に依存する飼育方法も検討されている。しかし、餌料生物の必要のない海産魚用の初期飼料がまだ実用化に至っていない現状では、飼育初期にはニフルスチレン酸ナトリウム浴を施した餌料生物を与え、遊泳力の付いた時点からは冷凍処理した餌料生物を与える方法がもっとも安全な現実的給餌方法であると考えられた。冷凍餌料だけでは栄養的欠陥があるとしても、切り替え時期を検討すれば、現在の初期飼料は、このような投与方法を許すところまで発達してきていると考えられる。

仔稚魚期の人工種苗に発生する疾病は細菌性疾病だけではなくウイルス性疾病の存在も現在では知られており^{4, 28)}、必要な対策は一樣ではない。わが国では観察例はないが、フランスではワムシ *B. plicatilis* にビルナウイルスと思われるウイルスが感染していた事例が報告され、ワムシを介して仔魚へのウイルス病の伝播の可能性が指摘されている⁸⁶⁾。ウイルス病対策は防疫体制の確立に頼らざるを得ないが、餌料に由来する細菌性疾病の相当部分は上述の対策によって防止もしくは軽減できると考えられる。

ところで、冒頭でも触れたように、我が国における海産魚類の種苗生産はここ30年ほどで飛躍的な発展を遂げてきた。しかし、生産数も生産機関も多くなって、いわば安定した成熟期にはいった魚種であっても、生産事例を細かくみれば生残率に極めて大きなばらつきがみられ、平均値でみればかなり低い生残率に甘んじているのが現状である。

例えば、西日本種苗生産機関連絡協議会魚類分科会の平成10年度資料にもとづいて、マダイ、クロダイ、ヒラメ種苗について各機関の生産回次ごとの生残率の平均値(その範囲)をもとめると、順に17.1(0~62.2)、39.4(17.7~64.9)、および30.0(0~69.1)%であった。また、アユ初期飼料研究会がとりまとめた平成9年度のアユ種苗生産状況によると回答のあった31機関の平均生残率は(回次ではなく機関単位の生残率しかないが)同様に30.4(12.5~78.4)%であった。毎年全国で2千万尾にもおよぶ種苗を放流しているマダイにおいてさえ、最高の生残率に比べて全国平均値は1/3にも届いていないし、クロダイの平均生残率は著者の量産実験(73.1%)の半分以下でしかない。また、アユにおいて

も全国平均生残率は著者が本論文中で実施した量産規模飼育試験の生残率(96.9%)に遠く及ばない。

現実には「工場生産的」にはほど遠いのである。

何故すべての生産機関、すべての生産回次の生残率をもっと高くならないのか著者なりに考えてみたい。

種苗生産技術とそれを支える現場技術者は、高い生残率と高い生残密度、そしてその安定した再現性の3つを目標に過去邁進してきた。仔稚魚の栄養要求さえ十分には明らかではなかった時代、例えばワムシにある栄養成分を加えて生産を行い、その結果飼育成績が改善されれば、翌年もそれを加えればよかつたし、結果が変わりなければ検討条件からそれをはずせばよかつた。つまりワムシに必須栄養素が欠けていた場合結果は明瞭であつたし、実際そのような試行錯誤の積み重ねによって大きな成果を築いてきたのである。

しかし、疾病の発生あるいは予防に関してはこの論理はあてはまらない。

この方法で飼育すれば疾病は必ず発生しないとか、逆に必ず発生するとかいった方法はほとんどないこと、あるのは疾病発生の確率を低くする方法もしくは高めてしまう方法でしかないことに現場技術者が気づいていないことが多いように思われてならない。新たな設備がほとんど不要な餌料生物の薬浴でさえ励行している機関がアユでほぼ半分しかなかったことを例としてもよい。餌料の薬浴をせっかく励行していたのに生残率に効果が明瞭に現れないとして止めてしまった機関があることも具体的な例に数えることができる。あるいは、ウイルス性疾病等について予算や設備の制約があるにしても、不十分な防疫対策しか採っていない機関が多いことをあげてもよい。

またこのことは、種苗生産期に発生する細菌感染症のほとんどが日和見病原体によるものと考えられることにも関係している。すなわち、宿主側の抵抗力が低下していても、たまたま病原菌がいなければ発病しないからである。

餌料生物を薬浴しなくても一応の成績を残せることがあるのは、こういったことによっている。実際、著者が実施したアユの飼育実験でもっとも成績が良かったのは無処理区であった。また、薬浴を励行していても疾病が発生することがある。すると次回は薬浴は必要ないと現場技術者は考えやすい。また現状でウイルス性疾病が発生していなければ、特別な防疫対策を新たに講じなくても、同じ方法を採る限り将来も発生しないだろうと考えてしまう。

前述の試行錯誤の論理に立つ限りこれは一見正しいかもしれないが、疾病に適用するのは誤りであり、これが本当の「安定化」を妨げている要因の一つになっているように著者には思える。栄養面での対処法と斃死予防の面での対処法では考え方を根本から変える必要がある。斃死の予防に関しては、過去の経験にいたずらに囚われることなく、採れる対策を十分に採って、疾病発生の確率を可能な限り減らし、高い生残率と高い生産密度での安定化を図るべきではあるまいか。また、発病機構を詳しく追跡する地道な研究を遂行しうる研究者・技術者を現場の飼育担当者とは別に配置することも考慮されるべきであろう。

謝 辞

稿を終えるにあたり、本研究をとりまとめる契機を与えて頂いたうえ終始御懇篤な御指導と御助言、励ましを賜り、さらに本論文の御校閲を頂いた恩師 広島大学生物生産学部（現広島大学大学院生物圏科学研究科）室賀清邦教授に謹んで深甚なる感謝の意を表します。

広島大学生物生産学部（同上）中川平介教授、松田治教授、および中井敏博助教授（現教授）には本論文をお読みいただき種々の有益な御助言を賜った。また、難波憲二教授および今林博道教授にはいろいろ有益なご助言を賜った。

広島大学生物生産学部水族病理学研究室（同上、現水族病理生物学研究室）の西澤豊彦助手（現北海道大学大学院水産科学研究科助教授）には多大な御指導と御助言を賜った。

本研究は水産庁からの魚病対策技術開発研究費によるところが大きかった。昭和59年度から5年間にわたる同研究の遂行にあたり種々の御指導、御便宜を図っていただいた水産庁研究部研究課井貫晴介課長補佐（当時）および日本水産資源保護協会小坂光昭魚類防疫部長（故人、当時）の両氏に深謝の意を表します。

ワムシの薬浴効果の再確認や栄養強化剤の影響に関する実験は、広島大学生物生産学部水族病理学研究室（当時）の惣明睦枝氏（現広島県栽培漁業協会）の御協力なくしては成し得なかった。

また、アンケート調査に快くご回答いただいた全国のアユ種苗生産機関および担当諸氏の方々にも厚く御礼申し上げます。

本研究の遂行やとりまとめに種々の御配慮や御指導、御鞭撻を頂いた岡山県水産試験場栽培漁業センターの杉山瑛之氏、片山勝介氏、浮田和夫氏、福田富男博士の歴

代所長、また岡山県水産試験場松村眞作場長に厚く御礼申し上げます。また、周年にわたって種苗生産事業に追われる栽培漁業センターで研究を実施していくには、職員各位の御理解と御協力が不可欠であった。ここに厚く御礼申し上げます。

要 約

本論文では、餌料生物の細菌汚染軽減方法について検討を行い、また、それら軽減方法を使用した場合の仔稚魚の成長や生残等への影響について検討を加えた。また、ワムシ中における細菌の動態や、細菌群の役割、栄養強化剤の影響等についても検討を加え、種苗生産の成績を向上させるための方策について考察を加えた。

第I章

全国のアユ種苗生産機関を対象にアンケートを実施し、主に魚病学的立場から昭和59～61（1984～1986）年度におけるアユ種苗生産時の餌料および大量斃死の状況等について調査した結果、以下のことがわかった。

- 1) ワムシおよび配合飼料は公立・民間すべてのアユ種苗生産機関で餌料として用いられていたが、アルテミア幼生、鶏卵黄、およびミジンコは公立よりも民間で多用される傾向にあった。また、ワムシが必要以上に長期間にわたって投与されている例が非常に多かった。
- 2) 年度による差はあったが、毎年41～51%の機関でアユ仔魚の大量斃死が発生していた。
- 3) ワムシおよびアルテミア幼生双方に薬浴処理を実施した機関におけるアユ仔魚の大量斃死発生率は、薬浴処理をまったくしない場合の半分以下であった。このことから、それら餌料生物の保有する細菌が何等かの形でアユ仔魚の大量斃死に関与している可能性が推察された。
- 4) アユ仔魚の大量斃死発生時の魚病学的検討結果をみると、細菌がまったく分離されなかったり、分離されても既知の魚病細菌ではなかった例が極めて多く、少なくとも単純な細菌感染症が主たる原因になっているとは考えられなかった。斃死原因を解明するにはウイルスチェックのほか仔稚魚の生理学的知見の集積が不可欠であると考えられた。

第II章

ワムシの保有する細菌数を減少させ、ひいては餌料由来の細菌性疾病発生の可能性を減少させる手法について

幾つかの検討を加えた。

- 5) ワムシの保有する細菌数に及ぼすニフルスチレン酸ナトリウム (NFS) 浴の影響を検討したところ、ZoBell's 2216e 寒天培地を用いて測定した一般細菌数には特に効果は認められなかった。しかし、BTBテイポール寒天培地上に増殖する *Vibrio* を主体とした細菌に対しては著効が観察され、4時間の薬浴 (1 mg/l) で3オーダー近い減少が認められた。この結果に裏付けられ、ワムシにおける *Vibrio* 属細菌の汚染軽減を目的にNFS浴は現在まで広く用いられている。
- 6) ワムシの保有する細菌に対する紫外線照射の影響について検討した結果、特に著しい細菌汚染軽減の効果はなかった。
- 7) ワムシおよびアルテミア幼生を -15°C に冷凍保存して、その細菌数を経時的に測定したところ、1か月あまりでBTB細菌数はワムシで5桁、アルテミア幼生で3桁それぞれ減少した。これらの著しい減少は *Vibrio* 属細菌が、*Moraxella* 属や *Pseudomonas* 属に比べて冷凍に対する抵抗性が低いためと考えられた。
- 8) 種苗生産期の病原菌として知られる *V. anguillarum* および *V. ichthyenteri* をワムシに人為的に高濃度に取り込ませた後に、 -15°C に冷凍保存して経時的に両魚病細菌の消長を観察したところ、いずれも30あるいは40日後には検出されなくなった。
- 9) 餌料生物の不適切な冷凍保存は栄養価の低下を招き、仔稚魚に悪影響を与える可能性がある。しかし、*Vibrio* 属細菌の減少の度合いはNFS浴と比べても極めて大きいので、冷凍中の栄養価低下に配慮しつつNFS浴との併用を工夫し、冷凍温度、冷凍期間、解冻後の給餌方法や給餌開始時期等を検討すれば、仔稚魚期の魚病の防止に本法は大いに役立つ可能性があると考えられた。

第三章

ワムシに抗生物質を作用させて菌数を一旦下げた後に、ワムシに由来する任意の菌株を取り込ませることにより、特定の優占種からなる菌叢を有するワムシを作出し、さらに滅菌海水中にワムシを移すなどしてその菌数の増減を観察した。

- 10) *Moraxella*, *Pseudomonas*, あるいは *Vibrio* 属の供試菌株を 1.0×10^8 CFU/ml の濃度に懸濁させた滅菌海水中で、ワムシはわずか1時間後にはいずれの菌をも $10^7 \sim 10^8$ CFU/g に取り込むことがわかった。また、

取り込み後に新たな滅菌海水に移しても *Vibrio* の場合は菌数が減少しなかったが、*Vibrio* 以外の *Moraxella* や *Pseudomonas* ではワムシの消化酵素によると思われる菌数の一時的な減少が観察された。

- 11) 以上の結果、ワムシに取り込まれた後の細菌の挙動は、大きく *Vibrio* と *Moraxella-Pseudomonas* グループの2つに分けられた。前者とワムシとの関係はある種の寄生または共生、後者との関係は基本的には捕食者・被捕食者の関係にあると推定された。

第四章

ワムシとアルテミア幼生に対するNFS浴や冷凍処理が、アユやクロダイ仔稚魚の成長、生残、および消化管内細菌叢等に及ぼす影響を検討した。

- 12) 対照区の42日齢におけるクロダイ仔魚の消化管内細菌数はNFS処理ワムシ投与区あるいは冷凍処理ワムシ投与区よりも一般細菌で3桁、BTB細菌で4桁も高かった。*Vibrio* の割合は、NFS区で28%、冷凍区で29%、対照区で100%であった。無処理区では概して細菌組成の変動が大きかった。
- 13) 成長、開腔率、30秒間の空中露出による活力試験では3試験区に差はなかったものの、対照区の生残率が26%と低かったのに対して、NFS区のそれは41%、冷凍区は73%と高かった。
- 14) NFS浴または冷凍保存した餌料生物をふ化当初からアユ仔稚魚に投与し80日間飼育したところ、対照区およびNFS区の生残率が97および78%と良好であったのに比べ冷凍区のそれは25%と著しく劣っていた。このことからふ化直後からの全面的な冷凍餌料への置換は実用的ではないことがわかった。
- 15) アユの消化管内細菌叢をみると、*Pseudomonas* の割合が無処理区、冷凍区、NFS区の順で高くなること等の影響が認められたが、*Vibrio* の割合に顕著な差はなく、NFS浴や冷凍保存した餌料生物を与えてもアユの消化管内細菌叢にあまり大きな影響を与えないことがわかった。

第五章

ワムシにおけるNFS浴 (5 mg/l) 効果の持続性およびNFS浴と栄養強化処理を同時に実施した場合の影響を検討した。

- 16) その結果、TCBS寒天培地によって得られた細菌数 (*Vibrio* 属細菌数) は3~5時間の薬浴により薬浴前の $10^6 \sim 10^7$ CFU/g から1~3桁減少し、NFS浴の有

効性が再確認された。しかし薬浴を終了して海水に移したS型ワムシのTCBS細菌数は、3時間後では薬浴終了直後とかわらぬ低い値であったが、6時間後には逆に薬浴前よりも1桁増加した。SS型ワムシでも薬浴によるTCBS細菌数の減少が観察されたが、薬浴終了17時間後には効果は消失していた。

- 17) NFS薬浴時に乳化油脂、油脂強化冷凍酵母および冷凍*N. oculata*をS型ワムシに併用した場合、薬浴開始5時間後のTCBS細菌数の減少は栄養強化を行わなかった薬浴区の場合と同程度であり、種苗生産現場における実用には支障ないものと判断された。

第VI章

餌料生物の細菌汚染軽減法のあり方や、種苗生産期の疾病防除方法、ひいては生産成績の向上と安定化対策について論議した。

- 18) 餌料生物の必要のない配合飼料が未だ実用化されていない現状で、種苗生産の成績、特に生残率を向上させるためには、餌料生物の細菌汚染の軽減が必要不可欠と考えられた。餌料生物にNFSによる薬浴を励行することで種苗生産の生残率が向上し安定することははっきりしているが、万全ではないことを考慮して、冷凍処理の積極的な活用も必要と考えられた。

文 献

- 1) 水産庁・(社)日本栽培漁業協会(1999)：平成9年度栽培漁業種苗生産入手・放流実績(全国)。pp1-111.
- 2) Muroga, K. (1992)：Bacterial and viral diseases of marine fish during seed production. NOAA Technical Report NMFS111, 57-61.
- 3) Muroga, K. (1992)：Hatchery diseases of marine fish in Japan. In "Diseases in Asian Aquaculture II" (ed. by M. Shariff, R. P. Subasinghe, and J. R. Arthur), FHS, AFS, Manila, pp.215-222
- 4) 室賀清邦(1995)：海産魚介類の仔稚におけるウイルス性および細菌性疾病。魚病研究, 30, 71-85.
- 5) 稲葉伝三郎・本荘鉄夫(1976)：アユの増殖, 「淡水増殖」(稲葉伝三郎編), 恒星社厚生閣, 東京, pp.324-341.
- 6) 大上皓久(1969)：アユ種苗の量産と放流。水産増殖, 16, 285-292.
- 7) 鶴川正雄(1969)：マダイ種苗の量産と放流。水産増殖, 16, 293-294.
- 8) 日野明徳(1994)：種苗生産, 「現代の水産学」(日本水産学会出版委員会編), 恒星社厚生閣, 東京, pp.124-131.
- 9) 平田八郎・森保樹(1967)：食用イーストの給餌によるシオミズツボワムシの培養。栽培漁業, 5, 36-40.
- 10) 今田克・景山百合明・渡辺武・北島力・藤田矢郎・米康夫(1979)：魚介類種苗生産用酵母(油脂酵母)の開発。日水誌, 45, 955-959.
- 11) 岡彬(1989)：各種餌料で培養したワムシの栄養価。「初期餌料生物—シオミズツボワムシ」(福所邦彦・平山和次編), 恒星社厚生閣, 東京, pp.148-157.
- 12) 北島力・塚島康生・藤田矢郎・渡辺武・米康夫(1981)：マダイ仔魚の空気呑み込みと鰓の開腔及び脊柱前弯症との関連。日水誌, 47, 1289-1294.
- 13) 武田雷介・田畑和男・片嶋一男(1975)：海水によるアユ種苗生産時の病害研究—I, ビブリオ病およびアルテミア幼生中のビブリオ菌の除去効果。水産増殖, 23, 80-84.
- 14) 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及びタマミジンコの細菌汚染。三重大水産研報, 2, 81-91.
- 15) 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ミジンコの汚染細菌除去について。三重大水産研報, 3, 87-99.
- 16) Skjermo, J. and O. Vadstein (1999)：Techniques for microbial control in the intensive rearing of marine larvae. *Aquaculture*, 177, 333-343.
- 17) 山野井英夫・杉山瑛之・片山勝介(1988)：アユの人工種苗生産における餌料と大量斃死に関するアンケート調査結果。水産増殖, 35, 213-222.
- 18) 山野井英夫・杉山瑛之(1987)：シオミズツボワムシの保有細菌数に及ぼすニフルスチレン酸ナトリウム薬浴と紫外線照射の影響。水産増殖, 35, 191-195.
- 19) 山野井英夫・片山勝介(1989)：シオミズツボワムシとブラインシュリンブ幼生の細菌叢に及ぼす冷凍保存の影響。日本水産学会誌, 55, 2207.
- 20) Yamanoi, H., T. Oda, K. Ukida, and K. Muroga (1990)：Effects of freezing on survival of *Vibrio anguillarum* and *Vibrio* sp. INFL group in rotifer. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 56, 1163.
- 21) 山野井英夫・萱野泰久・尾田正(1990)：クロダイ仔稚魚の成長, 生残, 及び消化管内細菌叢等に及ぼす餌料生物のニフルスチレン酸ナトリウム浴と冷凍保存の影響。水産増殖, 38, 13-22.
- 22) 山野井英夫・尾田正・浮田和夫(1990)：アユ仔稚魚の消化管内細菌叢に及ぼす餌料生物のニフルスチレン酸ナトリウム浴と冷凍保存の影響。水産増殖, 38, 327-332.

- 23) 山野井英夫・尾田 正・浮田和夫 (1990) : シオミズツボワムシにおける *Vibrio*, *Pseudomonas*, および *Moraxella* 分離菌株の実験的動態. 日本水産学会誌, 56, 461-466.
- 24) 山野井英夫・惣明睦枝・室賀清邦 (1998) : ワムシのニフルスチレン酸ナトリウム浴の効果持続時間と栄養強化剤の影響. 水産増殖, 46, 141-144.
- 25) Segers, H. (1995) : Nomenclatural consequences of some recent studies on *Brachionus plicatilis* (Rotifera, Brachionidae), *Hydrobiologia*, 313/314, 121-122.
- 26) 田畑和男・柄多 哲・M. S. Ruiz (1982) : 海水によるアユ種苗生産時の病害研究-Ⅱ, *Vibrio anguillarum* の動態. 魚病研究, 17, 205-212.
- 27) 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.
- 28) 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.
- 29) Muroga, K., M. Higashi and H. Keitoku (1987) : The isolation of intestinal microflora of farmed red seabream and black seabream at larval and juvenile stages. *Aquaculture*, 65, 79-88.
- 30) Wakabayashi, H., T. Toyama and T. Iida (1994) : A study on serotyping of *Cytophaga psychrophila* isolated from fishes in Japan. *Fish Pathol.*, 29, 101-104.
- 31) Iida, Y. and A. Mizokami (1996) : Outbreaks of coldwater diseases in wild ayu and pale chub. *Fish Pathol.*, 31, 157-164.
- 32) 江草周三編 (1981) : 水産用医薬品使用指針 2, 日本水産資源保護協会, 東京, 202pp.
- 33) Aaronson, S. (1970) : Experimental microbial ecology, Academic Press, New York, pp.1-236.
- 34) Tanasomwang, V. and K. Muroga (1989) : Effects of sodium nifurstyrenate and tetracycline on the bacterial flora of rotifers (*Brachionus plicatilis*). *Fish Pathol.*, 24, 29-35.
- 35) Tanasomwang, V. and K. Muroga (1992) : Effect of sodium nifurstyrenate on the reduction of bacterial contamination of rotifers. *Aquaculture*, 103, 221-228.
- 36) Munro, P. D., R. J. Henderson, A. Barbour and T. H. Birkbeck (1999) : Partial decontamination of rotifers with ultraviolet radiation: the effect of changes in the bacterial load and flora of rotifers on mortalities in start-feeding larval turbot. *Aquaculture*, 170, 229-244.
- 37) 白杵孝志・吉村研治・吉松隆夫 (1998) : 海産小型ワムシ高密度培養過程における細菌数の変化とその制御. 水産増殖, 46, 193-201.
- 38) Sugahara, I., T. Kimura, K. Hayashi and T. Tahara (1988) : Bacterial flora and effect of lytic enzyme on bacterial growth in mackerel muscle during storage. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 54, 1195-1198.
- 39) 増村和彦・安信秀樹・岡田直子・室賀清邦 (1989) : ヒラメ仔魚の腸管白濁症原因菌としての *Vibrio* sp. の分離. 魚病研究, 24, 135-141.
- 40) Muroga, K., H. Yasunobu, N. Okada and K. Masumura (1990) : Bacterial enteritis of cultured flounder *Paralichthys olivaceus* larvae. *Dis. Aquat. Org.*, 9, 121-125.
- 41) Ishimaru, K., M. Akagawa-Matsushita and K. Muroga (1996) : *Vibrio ichthyenteri* sp. nov., a pathogen of Japanese flounder larvae. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 46, 155-159.
- 42) Muroga, K., and H. Yasunobu (1987) : Uptake of bacteria by rotifer. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 53, 2091.
- 43) Yu, J. -P., A. Hino, R. Hirano and K. Hirayama (1988) : Vitamin B12 producing bacteria as a nutritive complement for a culture of the rotifer. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 54, 1873-1880.
- 44) 医科学研究所学友会編 (1976) : 細菌学実習提要, 改訂 5 版, 丸善, 東京, pp.407-421.
- 45) 松崎 統 (1977) : 真菌検査への招待, 第 1 版, 文光堂, 東京, pp.89-93.
- 46) 吉水 守 (1996) : ウイルス学的検査法, 「魚病学概論 (室賀清邦・江草周三編)」, 恒星社厚生閣, 東京, pp.144-148.
- 47) Hirayama, K., K. Takagi and H. Kimura (1979) : Nutritional effect of eight species of marine phytoplankton on population growth of the rotifer, *Brachionus plicatilis*. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 45, 11-16.
- 48) Balompapung, M. D., N. Munuswamy, A. Hagiwara and K. Hirayama (1997) : Effect of disinfectants on the hatching of marine rotifer resting eggs *Brachionus plicatilis* Müller. *Aquacult. Res.*, 28, 559-565.
- 49) Hino, A. and R. Hirano (1984) : Relationship between body size of the rotifer *Brachionus plicatilis* and the minimum size of particle ingested. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 50, 1139-1144.
- 50) 東原孝規・福岡誠一・安部敏男・木原一瓢・今田 克・平野礼次郎 (1983) : アルコール発酵母液を用いた微生物フロックによるシオミズツボワムシ *Brachionus plicatilis* の培養. 日水誌, 49, 1001-1013.
- 51) Hara, K., H. Arano and T. Ishihara (1984) : Purification of

- alkaline protease of the rotifer *Brachionus plicatilis*. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **50**, 1605-1609.
- 52) Hara, K., H. Arano and T. Ishihara (1984) : Some enzymatic properties of alkaline proteases of the rotifer *Brachionus plicatilis*. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **50**, 1611-1616.
- 53) 安田公昭・多賀信夫 (1980) : 餌料細菌を用いるシオミズツボワムシの培養. 日水誌, **46**, 933-939.
- 54) 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.
- 55) Rombaut, G., Ph. Dhert, J. Vandenberghe, L. Verschuere, P. Sorgeloos and W. Verstraete (1999) : Selection of bacteria enhancing the growth rate of axenically hatched rotifers (*Brachionus plicatilis*). *Aquaculture*, **176**, 195-207.
- 56) 岩田一夫・矢野原良民・石橋 制 (1978) : マダイの種苗生産過程におけるへい死要因に関する研究. 魚病研究, **13**, 97-102.
- 57) 楠田理一・横山 淳・川合研児 (1986) : クロダイ仔稚魚のいわゆる腹部膨満症に関する細菌学的研究. 日水誌, **52**, 1745-1751.
- 58) 北島 力 (1989) : 栄養欠陥ワムシとその改善法, 「初期餌料生物—シオミズツボワムシ」(福所邦彦・平山和次編), 恒星社厚生閣, 東京, pp.158-166.
- 59) Tanasomwang, V. and K. Muroga (1988) : Intestinal microflora of larval and juvenile stages Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Fish Pathol.*, **23**, 77-83.
- 60) Tanasomwang, V. and K. Muroga (1989) : Intestinal microflora of rockfish *Sebastes schlegelii*, tiger puffer *Takifugu rubripes* and red grouper *Epinephelus akaara* at their larval and juvenile stages. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **55**, 1371-1377.
- 61) 安信秀樹・室賀清邦・丸山敬悟 (1988) : マダイ仔魚の腸管膨満症に関する細菌学的検討. 水産増殖, **36**, 11-20.
- 62) Okamoto, A. (1992) : Restrictions on the use of drugs in aquaculture in Japan. In *Chemotherapy in Aquaculture: from theory to reality*. (C. Michel and D. J. Alderman ed.), OIE. Paris, pp.109-114.
- 63) Aoki, T. (1992) : Present and future problems concerning the development of resistance in aquaculture. In *Chemotherapy in Aquaculture: from theory to reality*. (C. Michel and D. J. Alderman ed.), OIE. Paris. pp254-262.
- 64) Alderman, D. J. and C. Michel (1992) : Chemotherapy in aquaculture today. In *Chemotherapy in Aquaculture: from theory to reality*. (C. Michel and D. J. Alderman ed.), OIE. Paris. pp3-24.
- 65) 青木 宙 (1998) : 魚類病原細菌の薬剤耐性. 月刊海洋, 号外No.14, 103-110.
- 66) 谷口朝宏 (1992) : ヒラメ種苗生産における冷凍アルテミア幼生の給餌効果について. 栽培技研, **21**, 7-14.
- 67) Sera, H. and Y. Ishida (1972) : Bacterial flora in the digestive tracts of file-fish. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **38**, 651-652.
- 68) 瀬良 洋・石田祐三郎 (1975) : 微生物の生態2. 相互作用をめぐる. 第1版, 東京大学出版会, 東京, pp53-70.
- 69) 坂崎利一 (1977) : 臨床細菌学, 講義篇, 講談社, 東京, pp3-23.
- 70) 清水 潮 (1990) : 沿岸環境調査マニュアルII. 水質微生物篇 (日本海洋学会編), 恒星社厚生閣. 東京, pp357-363.
- 71) 室賀清邦・鈴木康二・石橋矩久・野上欣也 (1989) : ガザミ幼生に発生したピブリオ病. 水産増殖, **37**(2), 133-141.
- 72) Muroga, K., K. Suzuki, K. Ishimaru and K. Nogami (1994) : Vibriosis of swimming crab *Portunus trituberculatus* in larviculture. *J. World Aquacult. Soc.*, **25**, 50-54.
- 73) 藤原正夢・上野陽一郎・岩尾敦志 (1993) : トリガイ浮遊養成の斃死原因と考えられる *Vibrio* 属細菌について. 魚病研究, **28**, 83-89.
- 74) Sugumar, G., T. Nakai, Y. Hirata, D. Matsubara and K. Muroga (1998) : *Vibrio splendidus* II as the causative agent of bacillary necrosis of Japanese oyster *Crassostrea gigas* larvae. *Dis. Aquat. Org.*, **38**, 111-118.
- 75) Sugumar, G., T. Nakai, Y. Hirata, D. Matsubara and K. Muroga (1998) : Pathogenicity of *Vibrio splendidus* II, the causative agent of bacillary necrosis of Japanese oyster larvae. *Fish Pathol.*, **33**, 79-84.
- 76) 吉村研治・大森庸子・吉松隆夫・田中賢二・石崎文彬 (1996) : 海産小型ワムシ *Brachionus rotundiformis* の高密度培養における好適通気法. 日水誌, **62**, 897-903.
- 77) 好井久雄・金子安之・山口和夫 (1972) : 食品微生物学, 技報堂, 東京, 513pp.
- 78) 日野明德 (1989) : 細菌による制御, 「初期餌料生物—シオミズツボワムシ」(福所邦彦・平山和次編), 恒星社厚生閣, 東京, pp.205-208.
- 79) Maeda, M., K. Nogami, M. Kanematsu and K. Hirayama (1997) : The concept of biological control methods in aquaculture. *Hydrobiologia*, **358**, 285-290.
- 80) Sugita, H., Y. Hirose, N. Matsuno and Y. Deguchi (1998) : Production of the antibacterial substance by *Bacillus* sp. strain NM12, an intestinal bacterium of Japanese coastal fish.

Aquaculture, 165, 269-280.

- 81) 杉田治男・石垣貴行・岩井悌作・鈴木由起子・岡野隆司・松浦聖寿・M. Asfie・青野英司・出口吉昭 (1998) : 沿岸魚類3種から分離した腸内細菌の抗菌活性. *水産増殖*, 46, 563-568.
- 82) Tanasomwang, V., T. Nakai, Y. Nishimura and K. Muroga (1998) : *Vibrio*-inhibiting marine bacteria isolated from black tiger shrimp hatchery. *Fish Pathol.*, 33, 459-466.
- 83) Nakamura, A., K. G. Takahashi and K. Mori (1999) : Vibriostatic bacteria isolated from rearing seawater of oyster brood stock: Potentiality as biocontrol agents for vibriosis in oyster larvae. *Fish Pathol.*, 34, 139-144.
- 84) Naviner, M., J.-P. Bergé, P. Durand and H. Le Bris (1999) : Antibacterial activity of the marine diatom *Skeletonema costatum* against aquacultural pathogens. *Aquaculture*, 174, 15-24.
- 85) Nakai, T., R. Sugimoto, K.-H. Park, S. Matsuoka, K. Mori, T. Nishioka and K. Maruyama (1999) : Protective effects of bacteriophage on experimental *Lactococcus garvieae* infection in yellowtail. *Dis. Aquat. Org.*, 37, 33-41.
- 86) Comps, M., B. Menu, G. Breuil and J.-R. Bonami (1991) : Viral infection associated with rotifer mortalities in mass culture. *Aquaculture*, 93, 1-7.