

培養水槽の表層のワムシと底層のワムシの細菌叢の比較

山野井英夫・萱野泰久

Comparison of Bacterial Flora between Surface Rotifer
and Bottom Rotifer in a Culture Tank

Hideo YAMANOI and Yasuhisa KAYANO

キーワード：シオミズツボワムシ, 細菌叢

It is well-known that rotifer cultured for mass seed production of various marine fish contains bacterial flora consisting principally of *Vibrio*, *Pseudomonas*, and *Moraxella* at about $10^7 \sim 10^8$ CFU/g. In still water, some of these rotifers are found at the surface, while others prefer the bottom. Some farming centers credit the excellent results to using surface rotifers only. In this report, bacterial flora were compared between two types. It was shown that there was no difference in their body length compositions, activities, or bacterial flora. Although some isolates (*Vibrio* spp.) were lethal to rotifers, there was no correlation with the proteolytic activity, chitin decomposing activity, lethal toxicity of the isolates or their origins.

魚介類の種苗生産事業において、大量培養されたシオミズツボワムシ *Brachionus plicatilis* (以下ワムシと記す) が極めて多くの細菌を保有することは既に知られており¹⁻⁵⁾、これに介在された魚病を予防する観点から薬浴や冷凍処理等が検討され⁶⁻¹¹⁾、また現場でも応用されてきた^{12, 13)}。一方、これらの前処理の方法に加えて、収穫前の培養水槽の通気を数時間から一夜止めて沈下したワムシを廃棄し、水面直下~10cm程度の表層に浮上したワムシのみを収穫する手法が一部で知られている。この手法には、ごみの沈殿除去だけでなく、活発なワムシを与えることで投与後も長く浮遊させて仔稚魚に効率的に摂餌させる意味合いもあるものと思われるが、薬に頼らずに好成績が得られると言われるにもかかわらず

ず詳しい検討がなされていない。特別な技術を要しないせいか種苗生産報告にも具体的な本法の採用例、記載例が見あたらないが、ここでは、この表層のワムシと底層に沈んだワムシとを細菌学的に比較検討したので報告する。

材料と方法

細菌叢の比較 1992年1月13日及び2月3日の2回、岡山水産試験場栽培漁業センターにおいてワムシの細菌叢調査を行った。ナンノクロロプシス *Nannochloropsis oculata* と油脂酵母 (協和発酵) を与えて約21°Cで大量培養したワムシを、培養水ごと15 l ポリバケツ等に収容して約4時間静置した。表層の数cmに集まったワムシ (以下、表層ワムシと記す) を、オープニング25 μmのプランクトンネットを用いて収穫し、次いで底に沈んでいたワムシ (以下、底層ワムシと記す) を別途に収穫した。ネット上のワムシを、裏側から濾紙を軽くあてて水分を切り、適量を秤量して滅菌ガラスホモジナイザーで滅菌海水とともにホモジナイズした。これを原液とし、滅菌海水を用いて10倍階段希釈した。各希釈段階からそれぞれ2枚のZoBell's 2216 e 寒天培地 (Difco Bacto Peptone 5.0 g, Difco Bacto Yeast Extract 1.0 g, FePO₄ 0.1 g, Difco Bacto Agar 15 g, 保存海水1,000 ml, pH7.5) に0.1 mlずつ接種して、25°Cで2日間培養した。出現したコロニーを計数してサンプル中の細菌数を算出するとともに、肉眼的特徴によりコロニーをグループ分けし、主なコロニーを釣菌して純培養とし、図1に示した簡易鑑別法¹⁴⁾により組成を明らかにした。

また、表層ワムシ及び底層ワムシの各250個体の体長を生物顕微鏡下でマイクロメーターを用いて別途測定した。

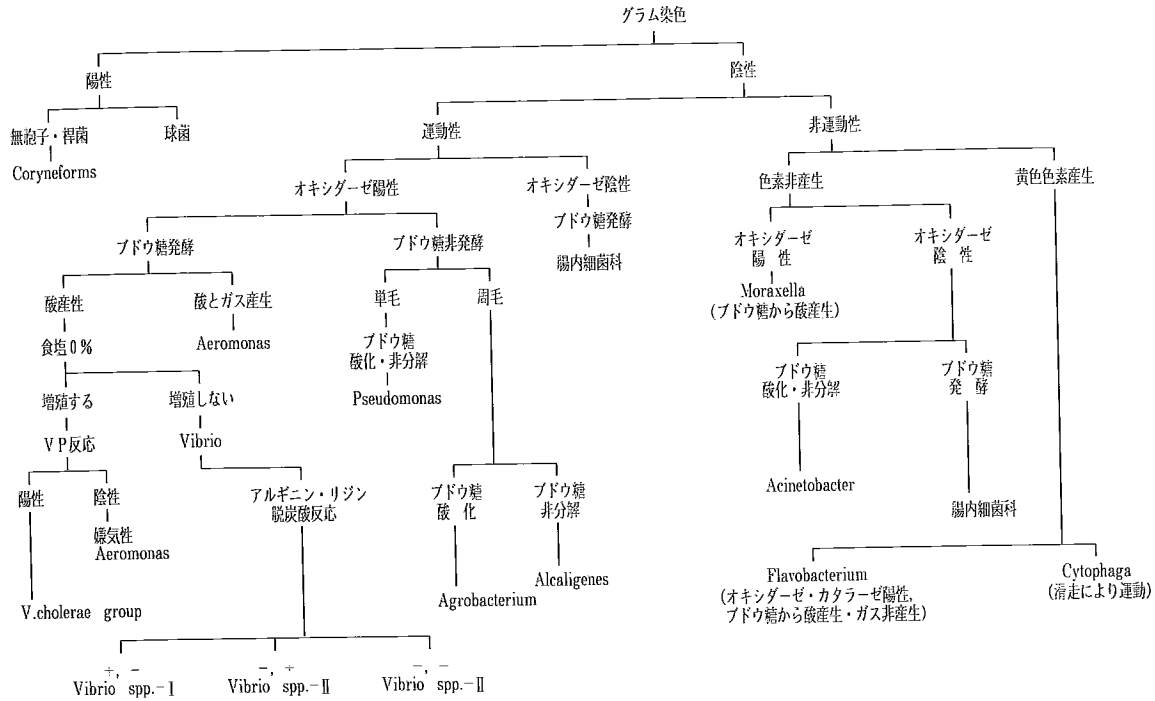


図1 分離菌株の簡易鑑別法

分離菌株のプロテアーゼ活性 ある種の魚病細菌では、菌体外毒素が産生されており、それはプロテアーゼとしての活性を有することが知られている¹⁵⁾。そこで、上述の調査によりワムシから分離された菌株を供して、下記の方法でそれらの菌体外産生物質 (Extracellular Products, 以下ECPと記す)を回収し、そのプロテアーゼ活性を測定した。

直径90mmのシャーレに作製しておいたZoBell's 2216 e寒天培地の表面に、シャーレより大きめに裁断して前処理し滅菌したセロハン (品番SE1142, Hofer Scientific Instruments) を重ねた。ZoBell's 2216 e寒天培地を使って25°Cで2日間培養した各菌株を5 mg/mlの濃度に滅菌海水に懸濁し、これを接種菌液とした。作製したセロハンプレートにこの菌液を0.2mlずつ接種してコンラージ棒で広げ、25°Cで1日培養した後、3 mlの滅菌リン酸緩衝食塩水を注ぎ、菌体とECPを回収した。次いで、12,000回転で12分間遠心処理し、その上澄みを0.22 μmのミリポアフィルターでろ過滅菌して、これを粗ECP液とした。

各菌株について得られた粗ECP液の0.1mlと、0.5mlの0.5%アゾカゼイン (Sigma Chemical Co.) 溶液及び蒸留水0.4mlを混ぜて、25°Cで20分間反応させた後、3.5mlの5%トリクロロ酢酸を加えて反応を停止させた。3,000回転で5分間の遠心処理により得られた上澄みに等量の0.5M NaOHを加えて、440nmで吸光度を

測定した。

分離菌株のキチン分解能 林の方法¹⁶⁾に準拠した下記の手法により、各菌株のキチン分解能を比較した。

試験管に分注したキチン分解細菌用培地 (キチン 4.0g, Difco Bacto Peptone 0.25g, Difco Bacto Yeast Extract 0.25g, Difco Bacto Agar 15g, 保存海水750ml, 蒸留水250ml, pH7.6) をオートクレーブ直後に軽く混和して急冷固化させ、キチンが均等に分散した白濁高層培地とした。次いで、ZoBell's 2216 e寒天培地を用いて25°Cで1日培養した供試菌を培地表面に接種して、25°Cで2週間培養し、生じた透明帯の深さを測定して比較した。

分離菌株のワムシに及ぼす影響 飼育水中に10⁸CFU/ml程度の高濃度に細菌が添加されると、ワムシはこれを短時間のうちに取り込み、その濃度は10⁸CFU/g前後に達することが知られている^{17,18)}。そこで、混在する細菌の影響を小さくするために、あらかじめ抗生物質で細菌数を低下させておいたワムシに、任意の菌株をそれぞれ取り込ませて、ワムシの活力等に与える影響を検討した。

約5,000個体/mlの濃度になるよう滅菌海水で調整したワムシ浮遊液100mlに、12mlの抗生物質混合液 (Penicillin-Streptomycin Mixture, penicillin 25,000 u・streptomycin 25 mg/ml, Whyttaker Bioproducts) と1mlの市販濃縮クロレラ (マリンア

ルファ, 日清製油) を加えて, 4時間作用させた。なお, この処置によりワムシの細菌数が約百分の一にまで減少することを別途確認した。次いで, これを収穫して一旦水を切った後, 滅菌海水に100個体/mlの濃度に再懸濁させた。100mlずつフラスコに収容した後, ZoBell's 2216 e 寒天培地を用いて25°Cで2日間培養した各菌株を40mgずつ懸濁させ, 10^8 CFU/ml以上の菌濃度とした。25°C条件下で24及び48時間後のワムシを計数, 観察した。対照には何も加えなかった。

結果と考察

まず表層ワムシと底層ワムシの体長組成を比較して図2に示した。なお2回の調査結果に顕著な差がなかったため, ここでは1回目の調査結果のみ示してある。底層ワムシの平均体長が168.4 μ mであったのに対し, 表層ワムシのそれは178.6 μ mとわずかに大きかったものの, 体長範囲はほとんど同じで, その差は顕著ではなかった。また万能投影機で観察した限りでは, 両者の遊泳行動はともに活発で, 色調にも差は見られなかった。

次いで, 表層ワムシと底層ワムシの細菌叢を表1に示

した。両調査時とも表層ワムシと底層ワムシの保有細菌数は 10^8 CFU/gを越えており, 大きな違いはなかった。また, その組成をみても, 第1回調査では*Vibrio*が, 第2回調査では*Moraxella*が表層, 底層いずれにおいても優占しており明瞭な差は認められなかった。

2回の調査で分離した各菌株の由来や優占率とプロテアーゼ活性及びキチン分解能を合わせて表2に示した。分離された菌株の多くでプロテアーゼ活性は低く, 吸光度0.20以上の比較的高いプロテアーゼ活性を有していたのは, No. 5, 7, 22, 24, 27, 30, 及び33の7株であった。また, これら7株はいずれも*Vibrio*ではあったが, 特に片寄った由来等はなく, 保有細菌のプロテアーゼ活性とワムシの収穫層とに関連は見いだせなかった。また, 8株が明瞭なキチン分解能を有していたが, そこにも片寄りは見られなかった。

ワムシの生残に及ぼす分離菌株の影響を表3に示した。プロテアーゼ活性の低い菌株にワムシ個体数を減少させたものはまったくなかった一方で, 高いプロテアーゼ活性を示した7株のなかでいずれも*Vibrio* spp.-Iグループに属するNo. 7, 24, 30, 及び33の4株は

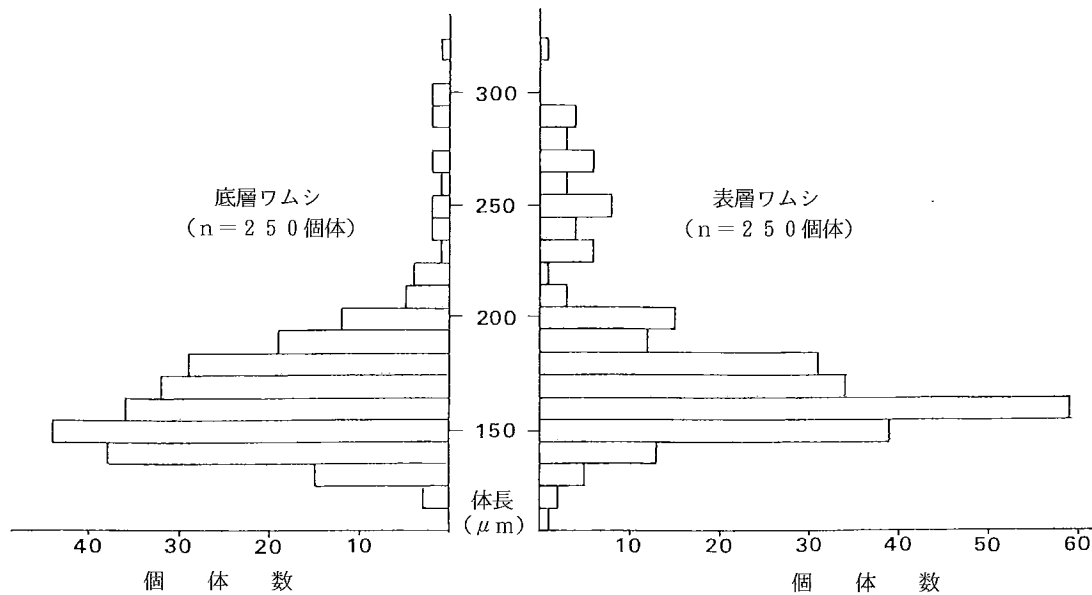


図2 表層ワムシと底層ワムシの体長組成

表1 表層ワムシと底層ワムシの細菌叢の比較

細菌数 (CFU/g)	優 占 率 (%)				
	<i>Moraxella</i>	<i>Pseudomonas</i>	<i>Vibrio</i> spp.-I	<i>Vibrio</i> spp.-II	<i>Vibrio</i> spp.-III
表層ワムシ 2.6×10^8			4	96	
底層ワムシ 3.6×10^8	11		6	82	
表層ワムシ 3.4×10^8	71		15	7	7
底層ワムシ 5.5×10^8	52	28	21		

CFU : colony forming unit

表2 分離菌株の由来と性状

由来	菌株No.	簡易鑑別結果	優占率 (%)	プロテアーゼ活性	キチン分解能(mm)
第1回調査 表層ワムシ	1	<i>Vibrio</i> -III	68	0.15	0
	3	"	14	0.17	0
	5	"	14	0.20	0
	7	<i>Vibrio</i> -I	4	0.38	3
第1回調査 底層ワムシ	8	<i>Vibrio</i> -III	53	0.13	0
	10	"	17	0.10	0
	12	<i>Vibrio</i> -I	6	0.12	6
	13	<i>Moraxella</i>	6	0.02	0
	14	<i>Vibrio</i> -III	6	0.17	0
	15	"	6	0.16	0
	16	<i>Moraxella</i>	5	0.01	0
第2回調査 表層ワムシ	21	<i>Vibrio</i> -I	9	0.13	5
	22	<i>Vibrio</i> -II	7	0.31	0
	23	<i>Vibrio</i> -III	7	0.19	0
	24	<i>Vibrio</i> -I	5	0.25	2
	25	<i>Moraxella</i>	71	0.01	0
第2回調査 底層ワムシ	27	<i>Vibrio</i> -I	10	0.31	3
	28	<i>Vibrio</i> -I	6	0.08	6
	29	<i>Pseudomonas</i>	4	0.16	0
	30	<i>Vibrio</i> -I	3	0.38	2
	31	<i>Pseudomonas</i>	23	0.11	0
	32	<i>Moraxella</i>	52	0.03	0
	33	<i>Vibrio</i> -I	2	0.22	2

表3 ワムシ濃度に対する分離菌株の影響

	菌株 No.	ワムシ濃度(個体/ml)	
		24時間後	48時間後
高プロテアーゼ活性 (吸光度0.2以上)	5	135	118
	7	75	15
	22	108	96
	24	78	27
	27	110	117
	33	94	19
低プロテアーゼ活性 (吸光度0.2未満)	1	126	118
	3	125	109
	8	146	124
	10	120	118
	12	112	108
	13	150	141
	14	132	143
	15	115	124
	16	123	127
	21	92	95
	23	100	74
	25	92	92
	28	120	108
	29	104	108
31	115	104	
32	102	98	
無添加	対照	126	114
	"	110	110

ワムシ個体数を著しく減少させた。

今回特には記載しなかったが、これら7株を紫外線で死滅させた後、遠心分離処理により洗浄して、その死菌体をワムシにそれぞれ投与しても、このようなワムシの急減は観察されなかったことから、この死滅に菌体内毒素が関与している可能性は低いと思われた。

これらのことから、ワムシの保有する細菌のなかにはワムシにとって極めて有害なものがあること、それらは比較的高いプロテアーゼ活性を有するグループIの*Vibrio*属細菌であること等がわかった。ECPに含まれ、かつプロテアーゼとしての作用を有するある種の菌体外毒素がワムシの死亡に関与しているものと考えられた。大量培養の現場でしばしば発生するワムシ個体数の急減現象には、何らかの原因で培養水中に優占したこれら有害細菌が関与したものも含まれている可能性がある。事実、著者の一人はかつて培養水槽のワムシ密度が一夜で3分の1程度に急減した際、ニトロフラン剤を投入することで翌日には元通りに回復させた経験がある(山野井, 未発表)。また、これら菌体外毒素がワムシのみならず仔稚魚にも有害性を持つとすれば、不調なワムシを与えるると仔稚魚も不調になるという現場の一般的経験もまんざら根拠のないものではないかもしれない。

しかし、表層ワムシと底層ワムシとの細菌叢の違いは明瞭ではなく、止水中で浮上するか沈下するかといった

ワムシの行動と細菌叢とに関連は見いだせなかった。調査回数が2回と決して十分ではないものの、少なくともワムシが沈下する事例のすべてに保有する細菌叢が関与しているとは考えられなかった。底層ワムシが投与された後も速やかに沈下するとすれば、浮遊時間の短さから仔稚魚に間接的な悪影響があるかもしれないが、底層ワムシのみが投与される事例は通常では考えられないのでこの可能性は除外できる。ただ、有害な細菌に冒されたワムシではまず遊泳行動が不活発になることが当然推測されるので、薬に頼らずにそのような個体を除去する方法として止水処置が有効に作用しているのかもしれない。表層ワムシのみを与えることが好成績につながるとすれば、このような解釈も一応は可能であろう。

要 約

1. ワムシ培養水槽の通気を停止した際に表層に浮上するワムシ（表層ワムシ）と底層に沈下するワムシ（底層ワムシ）を細菌学的に比較検討した。
2. 表層ワムシと底層ワムシの体長組成、色調、遊泳行動等に顕著な差はなかった。
3. ワムシが保有する細菌数やその組成を比較したが、そこにも顕著な差は認められなかった。
4. 分離された菌株のキチン分解能や、菌体外産生物質のプロテアーゼ活性を比較したが、ワムシの浮上あるいは沈下行動やそれら菌株の優占率等に関連を見いだすことはできなかった。
5. ワムシを致死させるある種の *Vibrio* 属細菌があることを確認したが、表層、底層いずれのワムシからも分離されるうえ、優占率も低かった。

文 献

- 1) 林孝一郎・木村俊夫・菅原 康, 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, 三重大学水産研報, 2, 81-91
- 2) 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, 13, 97-102
- 3) 田畑和男・塚多 哲・M. S. Ruiz, 1982: 海水によるアユ種苗生産過程の病害研究—Ⅱ, *Vibrio anguillarum* の動態, 魚病研究, 17, 205-212
- 4) 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

- 5) 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
- 6) 畑井喜司雄・安元 進・小川七郎・安永統男, 1976: 抗菌剤によるパン酵母ワムシ体内細菌の除去について, 昭和54年度長崎水試事業報告, 218-222
- 7) 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の影響, 水産増殖, 35, 191-195
- 8) 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プ幼生の細菌叢に及ぼす冷凍保存の影響, 日水誌, 55, 2207
- 9) V. Tanasomwang and K. Muroga, 1989: Effects of sodium nifurstyrenate and tetracycline on the bacterial flora of rotifers, 魚病研究, 24, 29-35
- 10) 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
- 11) H. Yamanoi, T. Oda, K. Ukida, and K. Muroga, 1990: Effects of freezing on survival of *Vibrio anguillarum* and *Vibrio* sp. INFL group in rotifer, 日水誌, 56, 1163
- 12) 柳本志津・萱野泰久・水戸 鼓, 1993: クロダイの種苗生産, 岡山水試報, 8, 87-89
- 13) 尾田 正・柳本志津・元谷 剛, 1993: アユの種苗生産, 岡山水試報, 8, 97-98
- 14) K. Muroga, M. Higashi, and H. Keitoku, 1987: The isolation of intestinal microflora of farmed red seabream (*Pagrus major*) and black seabream (*Acanthopagrus schlegeli*) at larval and juvenile stages, *Aquaculture*, 65, 79-88
- 15) H. Inamura, K. Muroga and T. Nakai, 1984: Toxicity of extracellular products of *Vibrio anguillarum*, *Fish Pathology*, 19, 89-96
- 16) 林孝一郎, 1985: 好気性従属栄養細菌, 門田 元・多賀信夫編, 海洋微生物研究法, 初版, viii+307pp, 69-80
- 17) K. Muroga and H. Yasunobu, 1987: Uptake of bacteria by rotifer, 日水誌, 53, 2091
- 18) 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, 日水誌, 56, 461-466