飼育水の pH 調整によるガザミ幼生真菌症の防除

安 信 秀 樹, 永 山 博 敏, 中 村 和 代, 畑 井 喜 司 雄

(1996 年 2 月 13 日 受 付)

Prevention of a Fungal Infection in the Swimming Crab
Portunus trituberculatus Larvae by High pH of Rearing WaterHideki Yasunobu,*¹ Hirotohi Nagayama,*²
Kazuyo Nakamura,*^{3,4} and Kishio Hatai*³

Halocrusticida (= *Atkinsiella*) *okinawaensis* was isolated from diseased swimming crab larvae *Portunus trituberculatus* in the Hyogo Prefectural Mariculture Center, and pathogenicity of the isolates was confirmed by infection experiments with zoeal larvae of the crab. The isolates grew in PYGS broth at pH 5-9, but the growth at pH 9.25 was remarkably reduced.

Experimental infections using zoea-I demonstrated that the infection with *H. okinawaensis* was controlled by keeping the pH of rearing water at 9.25. Acute toxicities of pH 9.25 to swimming crab zoea, rotifer *Brachionus plicatilis rotundiformis*, brine shrimp *Artemia salina*, and unicellular alga *Nannochloropsis* sp. were not observed. Survival rates of swimming crab larvae from zoea-I to juvenile crab-I in the center were apparently raised by applying this pH adjustment at 9.25.

キーワード: ガザミ, 真菌症, *Halocrusticida*, pH, 防除法

ガザミ *Portunus trituberculatus* の種苗生産は東北地方から九州までの全国各地で行われているが、疾病に起因する大量死亡がしばしば発生し、種苗が安定的に生産されているとは言い難い状況にある。

ガザミ幼生に発生する疾病としては、ビブリオ病¹⁾が知られているが、現在ガザミ種苗生産に深刻な被害を与えているのは真菌症である。

ガザミ幼生の真菌症の原因菌としては、クサリフクロカビ目に属する *Haliphthoros* 属, *Lagenidium* 属, *Sirospidium* 属および *Halocrusticida* 属^{4,5)} の菌が報告されている。²⁾ これらの菌に起因する真菌症は、発生すると短期間のうちにガザミ幼生を全滅させることが多いことから、これまでは治療法よりも真菌症の発生を防止する方法が検討されてきた。加治ら³⁾ はノコギリガザミのふ化幼生の *Haliphthoros* 属の菌に起因する真菌症の発生防止に、ふ化水槽内にホルマリンを投入する方法が有効で

あることを、また浜崎、畑井⁴⁾ は、他のクサリフクロカビ目の菌に起因するふ化幼生の真菌症に対しても、同方法が有効であったと報告している。ふ化幼生のホルマリン浴は、現在全国のガザミ種苗生産機関で多用されているが、この方法を実施しても、真菌症の発生を防除できない例がしばしば見られる。⁶⁾

兵庫県栽培漁業協会では、1990 年からガザミ種苗生産事業を実施している。真菌症の発生は 1991 年に初めて認められたが、その被害は軽微であった。しかし、その後の 2 年間は真菌症を予防する目的でふ化水槽でのホルマリン浴を実施したにもかかわらず、本症による多大な被害を受けた。また、幼生飼育水槽内へホルマリンを連続添加する方法も試みたが、その毒性によりガザミ幼生は死亡した。そこで飼育水槽内でも行えるガザミ幼生真菌症の防除法の開発を目的とし、1993 年および 1994 年の真菌症発生時に感染個体から真菌を分離し、

*¹ 兵庫県立水産試験場 (Hyogo Prefectural Fisheries Experimental Station, Futami, Akashi, Hyogo 674, Japan).

*² 兵庫県栽培漁業協会 (Hyogo Prefectural Mariculture Center, Futami, Akashi, Hyogo 674, Japan).

*³ 日本獣医畜産大学獣医学科魚病学教室 (Division of Fish Diseases, Nippon Veterinary and Animal Science University, Musashino, Tokyo 180, Japan).

*⁴ 現所属: めぐみ動物病院 (Megumu Animal Hospital, Nakagawara, Kisshoin Minami, Kyoto 601, Japan).

*⁵ 最近、これまでに報告された *Atkinsiella* 属の菌は *A. dubia* を除き、新属 *Halocrusticida* に移されたことから、⁵⁾ 本報ではそれに従うこととする。

*⁶ 浜崎浩幸: III-3 種苗生産技術の開発, L-7 のこぎりがざみ類, (1) ノコギリガザミ. 平成 5 年度日本栽培漁業協会事業年報, 221-222 (1995).

それらの病原性および生理学的性状について検討した。その結果、ガザミ幼生飼育水の pH を 9.25 に調整することにより、真菌症の蔓延を極めて有効に防除しうることが明らかになったので報告する。

材料および方法

真菌の分離と同定 1993 年 7 月および 1994 年 5 月に、兵庫県栽培漁業協会で飼育されていたガザミゾエアⅡ期幼生に真菌症が発生した際に、体内に菌糸が認められる幼生から真菌の分離を試みた。真菌の分離は、感染個体をベンジルペニシリンカリウムおよびストレプトマイシン硫酸塩をそれぞれ 10% 含む溶液で 3~5 回洗浄した後、カナマイシンを添加 (60 mg/l) した PYGS 寒天培地 (ペプトン 1.25 g, 酵母エキス 1.25 g, ブドウ糖 3 g, 寒天 12 g, 海水 1 l, 以下カナマイシン加 PYGS 寒天培地) に接種し、25℃ で培養する方法で行った。なお、本研究では原則としてトリスを 1% になるように添加した砂濾過海水 (塩分 31~34‰) を、pH を 8 に調整して使用した。

分離された真菌の同定は集落の形状、栄養体の形態、遊走子の形成様式および発芽様式などの性状を用いて行った。

病原性試験 兵庫県栽培漁業協会で飼育されていた健全なガザミゾエアⅠ期あるいはⅢ期幼生を用い、分離菌の病原性を調べた。海水を 30 ml 添加した 70 ml 容培養フラスコにゾエア幼生を 25 個体収容し、上述と同様の方法で調製した遊走子液を 10, 10², 10³ 個/ml となるように、また対照区には同量の海水を接種した。接種後無給餌、無通気で 25℃ の恒温器内に静置し、3 日後の真菌感染個体数および死亡個体数を観察した。真菌感染の有無は、幼生を顕微鏡で観察し、その体内に菌糸が発育しているか否かで判断した。なお、フラスコ内の海水にはベンジルペニシリンカリウムおよびストレプトマイシン硫酸塩を、それぞれ 400 µg/ml および 500 µg/ml になるように添加した。各試験は 2 回ずつ行い、得られた感染率と死亡率は平均値を算出して表示した。

生理学的性状

1. 発育温度 カナマイシン加 PYGS 寒天培地上で 25℃, 10 日間培養した供試菌の集落の辺縁をメスを用いて直径 3 mm 程度切り出し、10 ml のカナマイシン添加 (60 mg/l) 滅菌海水に接種し、25℃ で培養した。接種翌日に放出された遊走子を 10 ml のカナマイシン加 PYGS 液体培地に遊走子数が 10³ 個/ml となるように添加し、10~35℃ の範囲内の 6 段階の温度で 10 日間静置培養した。これらを超音波破砕機 (日本精機製作所 US-300) により 300 µA で 1 分間破砕後、分光光度計 (波長 600 nm) で吸光度を測定する方法により、発育

程度を測定した。

2. 発育 pH pH を 5~10 の範囲内に調整したカナマイシン加 PYGS 液体培地を作製し、それらに上記と同一方法で調製した遊走子浮遊液を同一数とするように接種した。25℃ で培養し、先と同様の方法で発育程度を調べた。

感染防除試験 pH を 8 および 9.25 に調整した海水 30 ml を 70 ml 容培養フラスコに添加した後、ゾエアⅠ期幼生を 25 個体収容し、10³ 個/ml の遊走子濃度で攻撃を行った。その他の条件は、病原性試験と同じとした。

ガザミ幼生飼育に及ぼす pH の短期的な影響 ガザミ幼生飼育に及ぼす pH の急性毒性を明らかにするために、ガザミゾエア、餌料生物、ナンノクロロブシス *Nannochloropsis* sp. の生残、およびガザミ卵の発生に及ぼす pH の影響を以下の項目について試験した。なお、ガザミゾエアおよび餌料生物に対する試験では、pH とアンモニア相互の影響についても検討した。ナンノクロロブシスについては、培養に硫化アンモニウムを窒素源として添加しており、アンモニア濃度が高い状態で培養されることが通常であることから、アンモニアの影響については検討しなかった。またガザミ卵についても、抱卵ガザミを養成する場合には餌料を与えないか、与える場合でも生きアサリを与える程度であること、さらに換水率も 1 時間当たり 1 回転以上で、アンモニア濃度が上昇するような環境にならないことから、アンモニアの影響については検討しなかった。

1. ガザミゾエア pH を 8~10 の範囲で、またそれらを塩化アンモニウムでアンモニア窒素濃度を 0~8 ppm の範囲で組み合わせて調整した海水 500 ml を作製し、それらの各海水にガザミゾエアⅠ期幼生を 20 個体ずつ収容し、無通気、無給餌で 23℃, 24 時間後の生残率を測定した。

2. 餌料生物 上記と同様に pH を 8~10 に、アンモニア窒素濃度を 0~8 ppm に組み合わせて調整した海水 5 ml に、S 型シオミズツボワムシ *Brachionus plicatilis rotundiformis* (以下ワムシ) およびふ化後 24 時間以内のアルテミア幼生 *Artemia salina* を 20 個体収容し、無通気、無給餌で 23℃, 24 時間後の生残率を測定した。なお、ワムシの場合携卵個体が存在し、24 時間後には当初の個体数より増加することがあるため、生残率は 24 時間後の全個体数に対する生残個体の割合として示した。また、海水にはベンジルペニシリンカリウムおよびストレプトマイシン硫酸塩を、それぞれ 400 µg/ml および 500 µg/ml になるように添加した。

3. ナンノクロロブシス 培養したナンノクロロブシスを 1×10⁶ 細胞/ml になるように海水で希釈し、300

mlのpHを8~10に調整した。温度25°C, 照度1500 lx, 明暗周期12 hL:12 hDの条件で通気しながら培養し, 経時的に分光光度計(波長560 nm)で吸光度を測定した。

4. ガザミ卵 pHを8~10に調整した海水30 mlに, 産卵3日後の卵割期の卵および産卵14日後のふ化直前の卵をそれぞれ100粒収容し, 23°Cで24時間後の発生率を測定した。

ガザミ幼生飼育に及ぼすpHの長期的な影響 pHを調整しない自然海水あるいはpH9~10に調整した海水100 lにガザミふ化幼生を3,500個体収容し, 事業生産に準じ,*7 ナノクロロブシス, ワムシ, アルテミア幼生および配合飼料を与えて23°Cで飼育を行い, 経時的に生残数を容量法により計測した。なお, 飼育期間はゾエアⅣ期変態までとし, 飼育水のpHは, 毎朝50%工業用酸化ナトリウム溶液を水道水で0.1~1%程度に希釈した液で調整した。

事業生産における利用 ガザミ種苗生産事業における利用には100 m³の屋内円形水槽を用い, 幼生の飼育水にはナノクロロブシスを5~10×10⁵細胞/mlとなるように添加し, 飼育水は23°Cに調整した。飼育水のpH調整は上述の希釈水酸化ナトリウム溶液を, 飼育水槽の横に配置した0.5 m³ FRP水槽から直径6 mmのビニールチューブを用い, サイフォン方式で幼生飼育水槽に滴下することにより行った。滴下時間は毎朝水酸化ナトリウム溶液を作製し, バッチ換水が主体の時(およそゾエアⅢ期まで)はその日の夕方に, 終日流水飼育の時(ゾエアⅣ期以降)には翌朝までに, 全ての溶液が滴下し終わるように調整した。pH調整期間はゾエアⅣ期もしくはメガロバ期までとした。ふ化幼生の収容密度は原

則として30,000個体/m³とし, 飼料としてワムシ, アルテミア幼生および配合飼料を与え, その後アサリミンチを適宜与えて第1齡稚ガニまで飼育した。

結 果

真菌症発生状況 真菌症は以下のような飼育条件下で発生した。すなわち兵庫県栽培漁業協会におけるガザミ種苗生産は主に100 m³の屋内円形水槽5面で, また補助的に100 m³の屋外角形水槽も使用して実施されていた。真菌症は1991年に初めて発生したが, その被害は軽微であった。しかし, 1992年および1993年には, 真菌症の発生防除を目的として, ふ化水槽に25 ppmとなるようにホルマリンを投入していたにもかかわらず, 真菌症の発生により, ガザミ幼生の生産が不能に陥った(Table 1)。すなわち, 種苗生産事業は, 両年とも5月から開始されたが, 真菌症の発生はその当初から認められ, 1992年は生産回次34回中32回で, また1993年は37回中21回で真菌症が発生し, 多くの場合発生後2~3日で全滅する例が多かった。なお, 真菌症はゾエアⅠおよびⅡ期に多発する傾向があり, ゾエアⅣ期での発生はまれであった。また, 屋内水槽と屋外水槽とを比較すると, 真菌症発生後の生残率は, 屋内水槽よりも屋外水槽の方が高い傾向があった。

分離菌の同定 1993年と1994年とに分離された真菌(ZH93株およびZH94株)は, いずれもカナマイシン加PYGS寒天培地上で1~3 mmの小さな, やや淡黄色の集落を形成した。常法に従って同定を試みた結果, 本菌は*Halocrusticida okinawaensis*に同定された。^{5,6)}

病原性試験 ZH93株およびZH94株を用いて, ゾエアⅠ期幼生に対する病原性試験を行った(Table 2)。

Table 1. Occurrence of fungal disease in larvae of swimming crab at Hyogo Prefectural Mariculture Center

Year	Tank (m ³)	Production trials	Number of trials with fungal disease occurrence	Mean survival rate* (%)
1992	Indoor 100	27	26	0.8
	Outdoor 100	7	6	4.5
	Total	34	32	0.3
1993	Indoor 100	20	17	1.3
	Outdoor 100	6	4	4.6
	" 70	11	0	4.3
	Total	37	21	2.6

* Survival rate = $\frac{\text{Number of surviving juvenile crab-I}}{\text{Number of zoea-I}} \times 100 (\%)$

*7 五利江重昭, 石飛博敏, 桑 教司, 吉川孝司: ガザミ種苗生産事業. 平成2・3年度兵庫県栽培漁業センター事業報告, 143-148 (1993).

Table 2. Mortality of swimming crab zoea-I artificially infected with *Halocrusticida okinawaensis* at 25°C

Strain	Dose (zoospores/ml)	Infection rate (%)	Mortality (%)
ZH93	10 ³	61	43
	10 ²	0	6
	10	0	0
ZH94	10 ³	74	62
	10 ²	38	24
	10	4	2
Control	—	0	0

Culture bottles containing 25 zoeae each were exposed to zoospores and infection rate and mortality were observed 3 days after inoculation.

Each test was repeated two times.

pH of water: 8.0.

Table 3. Comparison in susceptibility to *Halocrusticida okinawaensis* between swimming crab zoea-I and zoea-III by artificial infection at 25°C

Strain	Stage of zoea	Dose (zoospores/ml)	Infection rate (%)	Mortality (%)
ZH93	I	10 ³	61	43
		10 ²	0	6
		10	0	0
	III	10 ³	24	22
		10 ²	0	8
		10	0	6
ZH94	I	10 ³	74	62
		10 ²	38	24
		10	4	2
	III	10 ³	84	92
		10 ²	2	5
		10	0	4
Control	I	—	0	0
	III	—	0	4

Culture bottles containing 25 zoeae each were exposed to zoospores and infection rate and mortality were observed 3 days after inoculation.

Each test was repeated two times.

pH of water: 8.0.

ZH93 株では遊走子数 10³ 個/ml で感染率 61%, 死亡率 43% であったが, 10² 個/ml 以下では感染が見られなかった。いっぽう, ZH94 株は遊走子数が 10³ 個/ml で,

感染率 74%, 死亡率 62% であり, ZH93 株よりも若干高い値を示した。また, 遊走子数 10 個/ml の場合でも感染性を示した。

ゾエア I 期および III 期幼生を用い, 发育段階による供試菌に対する感受性の差異を検討した結果 (Table 3), 发育が進んだゾエア III 期幼生の方が感受性がやや低下する傾向が認められたものの, 明確な差異は認められなかった。

生理学的性状 ZH93 株の发育可能温度域は 15~35°C の範囲であったが, 35°C での发育は軽微であり, 发育至適温度域は 25~30°C にあると判断された (Fig. 1)。

ZH93 株は pH 5~9 の範囲で发育が認められたが, pH 9 を越えると发育は認められなかった (Fig. 2)。また ZH94 株は pH 7~10 についてのみ検討したが, ZH93 株とはほぼ同じように, pH 9 を越えると发育が微弱となった (Fig. 3)。

Fig. 1. Effect of temperature on the growth of *Halocrusticida okinawaensis* ZH93 in PYGS broth (pH: 8.0).

OD was measured 10 days after inoculation.

Fig. 2. Effect of pH on the growth of *Halocrusticida okinawaensis* ZH93 in PYGS broth.

OD was measured after 10 days' incubation at 25°C.

Fig. 3. Effect of pH on the growth of *Halocrusticida okinawaensis* ZH94 in PYGS broth.

OD was measured after 10 days' incubation at 25°C.

感染防除試験 分離菌は pH 9.25 ではほとんど発育しなかったことから、飼育水の pH を 9.25 に調整することによって、真菌感染を防除できるか否かを試みた (Table 4)。飼育水の pH を自然海水とはほぼ同じ pH 8 に調整した区では、ZH93 株と ZH94 株による感染率が 60% と 86%、また死亡率が 47% と 73% であったのに対して、飼育水の pH を 9.25 に調整した区では、ZH93 株では感染と死亡がともに認められず、また ZH94 株でも感染率が 2% で死亡率が 4% と、いずれも低い値を示した。いっぽう、遊走子を添加しない対照区は、pH 9.25 区で 2% の死亡が認められたが、ゾエアの活発な遊泳が観察され、死亡の見られなかった pH 8 区と比較して、活力などに差は認められなかった。

ガザミ幼生飼育に及ぼす pH の短期的な影響 ガザミのゾエア幼生に対する pH の影響を検討したところ (Fig. 4)、アンモニア窒素濃度 8 ppm では pH 9.25 で死亡率が 20% であった。また 4 ppm の場合、pH 9.25 では若干の死亡が認められ、pH 9.50 では 40% の死亡率であった。しかし、アンモニア窒素 2 ppm 以下では pH 9.50 まで幼生の死亡は認められなかった。

餌料生物であるワムシとアルテミアに対する pH の影響を検討したが、いずれにおいても生残率は 91% 以上であり、高 pH、高アンモニアによる悪影響はみられなかった。

ナンノクロロプシスに対する pH の影響を試験した結果 (Fig. 5)、培養 1 日目には、いずれの pH においても細胞数の増加が認められたが、培養 2 日目には pH 8 と pH 9.25 で、培養 3 日目には pH 9.50 で、培養 4 日目には pH 9.75 で細胞数の減少が認められた。しかし、pH 10 の場合、細胞数は培養 4 日目においても増加する傾向を示した。

卵の発生に対する pH の影響を検討したが、産卵 3 日

Table 4. Effect of pH on the mortality of swimming crab zoea-I artificially infected with *Halocrusticida okinawaensis* at 25°C

Strain	pH	Infection rate (%)	Mortality (%)
ZH93	8.00	60	47
	9.25	0	0
ZH94	8.00	86	73
	9.25	2	4
Control	8.00	0	0
	9.25	0	2

Culture bottles containing 25 zoeae each were exposed to zoospores of 10^3 per ml and infection rate and mortality were observed 3 days after inoculation.

Each test was repeated two times.

Fig. 4. Effect of pH on the toxicity of ammonia to swimming crab zoea-I at 23°C.

Period of experiment was 24 hours. Symbols indicate 0 (●), 1 (○), 2 (■), 4 (□) and 8 (▲) ppm ammonia-N concentrations.

Fig. 5. Effect of pH on the growth of *Nanochloropsis* sp. at 25°C.

Incubation was performed under illumination of 1,500 lx with 12 hL:12 hD photo-cycle. Symbols indicate pH 8 (●), 9.25 (■), 9.5 (▲), 9.75 (○), 10 (□).

Fig. 6. Survival rate of swimming crab larvae exposed to various pH levels at 23°C.

Zoeae were fed rotifer and brine shrimp, and *Nannochloropsis* sp. was introduced into rearing water.

Symbols indicate untreated sea water (●), pH 9.25 (■), 9.5 (▲), 9.75 (○), 10 (□).

後の卵割期期には、pH はほとんど影響せず、pH の上昇とともに発生率が若干減少する程度であった。産卵 14 日後のふ化直前の卵は、付着肢からの剥離作業の影響と思われる発生率の全体的な低下が認められたが、pH の上昇に伴う発生率の低下はほとんど認められなかった。

ガザミ幼生飼育に及ぼす pH の長期的な影響 異なる pH でガザミのゾエア幼生を継続飼育し、脱皮や変態への影響などについて検討したところ (Fig. 6), 飼育水

の pH を 9.75 および 10 に調整した区では、飼育開始後 1 日目に、pH 9.50 に調整した区では飼育開始後 2 日目に大量死亡が認められた。いっぽう、pH 9.25 に調整した区における生存率は、自然海水を用いた通常飼育と同じように推移し、幼生の活力や成長、および脱皮や変態についても通常飼育と変わりなく推移した。

事業生産における利用 1994 年度の兵庫県栽培漁業協会のガザミ事業生産結果を Table 5 に示した。飼育 1~5 回次は、pH 調整を行わない従来の方で種苗生産を行った。その際の真菌症防除対策としては、ふ化水槽でのホルマリン浴を行っていたが、全ての飼育回次でゾエア II 期で真菌症が発生した。このため真菌症発生水槽の飼育水の pH を 9.25 に調整した結果、ゾエア IV 期には、真菌による死亡は認められなくなった。なお、1~4 回次では pH 調整をメガロバ期も行ったが、メガロバ変態後 2 日目で降稚ガニ変態期まで死亡が多く認められた。そこで、5 回次以降は pH 調整をゾエア IV 期までとしたところ、メガロバ期の死亡はみられなくなった。6 回次からはゾエア I 期収容からゾエア IV 期までの間、pH 調整を継続して行った結果、稚ガニ I 期までの生存率が 15~50% となった。

考 察

これまでにガザミのゾエア幼生から分離された真菌の多くはクサリフクロカビ目に属している。²⁾ これらはすべて組織内寄生菌であることから感染後の治療は困難と考えられ、感染防除には真菌から遊出する遊走子を不活

Table 5. Effect of pH on occurrence of fungal disease in swimming crab larvae

Production trial	Number of surviving juvenile crab-I ($\times 10^4$)	Survival rate*1 (%)	pH*2			Period of pH-control	Occurrence of fungal disease
			min.	max.	mean		
1	25.1	7.5	9.16	9.40	9.28	Z3~M	+
2	20.8	6.8	8.98	9.35	9.22	Z2~M	+
3	13.6	3.3	9.14	9.34	9.27	Z3~M	+
4	20.3	5.8	8.96	9.42	9.22	Z2~M	+
5	38.7	11.9	9.02	9.39	9.22	Z2~Z4	+
6	57.8	15.2	9.08	9.33	9.19	Z1~Z4	-
7	64.6	31.2	9.01	9.34	9.18	Z1~Z4	-
8	105.5	50.0	9.12	9.38	9.23	Z1~Z4	-
9	96.1	39.2	9.00	9.32	9.18	Z1~Z4	-
Total	442.5	17.1					

*1 Survival rate = $\frac{\text{Number of surviving juvenile crab-I}}{\text{Number of zoea-I}} \times 100 (\%)$

*2 pH value for pH-controlled period.

Water temperature: 19.4~26.1°C.

Z: Zoea, M: Megalopa.

化する必要がある。これまでガザミ種苗生産における真菌症防除法として、ふ化幼生のホルマリン浴が広く行われてきた。^{3,4)}しかし、ホルマリン浴を行ったゾエア幼生を飼育水槽へ移槽する際に、飼育水槽への遊走子の混入を防除することは困難である。また、原因菌は通常宿主特異性が低いことから、³⁾取水海水から新たに侵入する可能性もある。そこで飼育水槽内でも行える真菌症防除法の開発を検討した結果、*Halocrusticida okinawaensis*に起因する感染症は飼育水のpHを9.25に調整することで、極めて有効に防除しうることが明らかになった。なお、分離株は15~35℃の範囲内で発育可能であったことから、本病を加温により制御する方法も考えられたが、ガザミに対して病原性をもつ真菌のうち、38℃でも発育するものが認められていることや、⁷⁾加温費用の面から事業生産での利用は困難と判断されたことから検討しなかった。

屋外水槽における飼育水のpHは、珪藻、ナノクロロプシスなどの植物プランクトンの光合成により、通常pH 7.9~8.8の範囲を推移しているが、日射量の多い時などは9.0を超えることもある。⁸⁾植物プランクトンの光合成による酸素の発生で、溶存酸素量が121~145%に達すると、ガザミゾエア幼生にガス病が発生することがある。⁹⁾飼育水の溶存酸素量とpH値とは、ある程度相関性があるため、¹⁰⁾ガス病防止策として、飼育水のpHを8.5以下に保つ方法が提案されており、¹¹⁾これにより実際の種苗生産現場では、飼育水のpHを8.2~8.6に調整することが推奨されてきた。⁸⁾本研究では飼育水のpHを9.25に調整することにより、真菌症を防除することに成功したが、pHの調整は水酸化ナトリウムで行われており、光合成によるpHの上昇とは異なり、酸素の発生がないことから、pH上昇によるガス病の発生は認められなかった。

いっぽう、pHの上昇は、飼育水中に含まれるアンモニアの毒性を増加させる。¹²⁾ゾエアに対するアンモニアの急性毒性についてもpH 8.2~9.0の範囲で検討されているが、それによるとゾエアⅠ期幼生では、24時間半数致死濃度がアンモニア窒素として、pH 9.0で5.9~6.2 ppmであり、ゾエアⅣ期幼生では12 ppmである。¹³⁾兵庫県栽培漁業協会における1994年度種苗生産期間中の飼育水のアンモニア窒素濃度は、ゾエア期間で最高0.68 ppm、メガロバ期で最高1.82 ppmであったが、通常は0.5 ppm以下で推移することが知られている。⁸⁾本研究において、pHとアンモニアのガザミゾエア幼生に対する毒性を検討したが、通常のアンモニア窒素濃度では、pH 9.25による急性毒性は現れないと判断

された。しかし、ゾエア期間のアンモニア窒素が最高3.5 ppmに達する例もみられることから、^{*8)}飼育水のpHを9.25に調整する場合には、アンモニア窒素の濃度は2 ppm程度以下に調整する必要があると判断される。

脱皮以外の時期の場合、ゾエア幼生はpH 6~9に調整した海水に24時間収容されても生残率に影響は認められないが、脱皮時期には、pH 7~8以外では生残率が低下することが確認されている。¹⁴⁾本研究ではゾエア期間を通じて種々のpHで飼育を継続したが、pH 9.25に調整した区とpHを調整しない通常の飼育水との生残率に、差異は認められなかった。これは本研究では、ふ化から種々のpHの海水に幼生を収容し、pHが急変しない条件で実験を行った結果と考えられる。したがって、ガザミゾエアにpH 9.25処理を行う際には、pHを急変させないように行う必要があり、特に脱皮期間には注意する必要があると判断される。

また、pH 9.25処理は餌料生物であるワムシ、アルテミアや水質安定のために添加されるナノクロロプシスに対しても、悪影響を及ぼさないことから、実際の種苗生産において十分利用できることが明らかになった。さらに、ふ化直前の卵に対してもpH 9.25処理は影響を及ぼさないことから、ふ化水槽におけるpH 9.25処理を行うことが可能である。これらの試験成績をもとに、兵庫県栽培漁業協会では、事業生産規模でふ化からゾエア期までの期間、連続してpH 9.25処理を行い、種苗生産を行った。その結果、真菌症の発生は認められず、第1齢稚ガニまでの歩留まりが15~50%となり、事業生産規模でも十分利用可能であることが確かめられた。

なお、pH処理を行う期間については、本菌に対する感受性が、ゾエア幼生の発達段階が進むにしたがって、やや低下する傾向がみられたことや、実際の発症がガザミ期に限られていること、および、メガロバ期までpH 9.25処理を行ったところ、幼生の活力低下が認められたことなどから、ゾエア期に限って良いと判断される。

謝 辞

研究の機会を与えて下さった、兵庫県但馬栽培漁業センターの山内幸児所長に感謝します。また、本研究を進めるにあたり、御協力いただいた兵庫県栽培漁業協会の穂 秀隆技師をはじめ、職員各位に深く感謝します。貴重な御助言をいただいた、兵庫県立水産試験場の五利江重昭主任研究員、兵庫県但馬水産事務所試験研究室の長井 敏研究員、広島県水産試験場淡水魚支場の飯田悦左研究員に感謝します。

*8 野村裕美, 神野芳久, 水野 豊: 特産高級魚種苗生産試験(ガザミ-X), 平成3年度鹿児島県栽培漁業センター事業報告, 46-52 (1993).

文 献

- 1) 室賀清邦, 鈴木康二, 石橋矩久, 野上欣也: ガザミ幼生に発生したピブリオ病. 水産増殖, 37, 133-141 (1989).
- 2) 浜崎活幸, 畑井喜司雄: ガザミおよびノコギリガザミの卵と幼生から分離された卵菌類の病原性について. 日本誌, 59, 1059-1066 (1993).
- 3) 加治俊二, 兼松正衛, 手塚信弘, 伏見 浩, 畑井喜司雄: ノコギリガザミの卵およびふ化幼生のハリフトロス症に対するホルマリン浴の効果. 日本誌, 57, 51-55 (1991).
- 4) 浜崎活幸, 畑井喜司雄: ガザミおよびノコギリガザミの卵とふ化幼生の真菌症に対するホルマリン浴の効果. 日本誌, 59, 1067-1072 (1993).
- 5) K. Nakamura and K. Hatai: *Atkinsiella dubia* and its related species. *Mycoscience*, 36, 431-438 (1995).
- 6) K. Nakamura and K. Hatai: Three species of Lagenidiales isolated from the eggs and zoeae of the marine crab *Portunus pelagicus*. *Mycoscience*, 36, 87-95 (1995).
- 7) 浜崎活幸, 畑井喜司雄: ガザミ卵寄生菌類の特性およびふ化幼生のホルマリン浴による真菌症防止効果. 栽培技研, 22, 99-108 (1994).
- 8) 和田 功, 丹下勝義: II 種苗生産, 3 幼生飼育. 「水産増殖叢書 32, ガザミ種苗の量産技術」(ガザミ種苗生産研究会), 日本水産資源保護協会, 石崎書店, 東京, 1983, pp. 55-112.
- 9) 今 攸, 山本 巖, 石田信一: 溶存酸素の過飽和によるガザミ幼生のガス病. 水産増殖, 16, 73-80 (1968).
- 10) 佐野和生: 養鱈池の水質. 水産増殖, 6, 61-71 (1959).
- 11) 宇都宮 正: ガザミ種苗生産に関する研究—I, 飼育水の pH・溶存酸素量の変化と幼生の歩留り. 山口内海水試研業, 18, 39-48 (1969).
- 12) 田端健二: 水産動物に及ぼすアンモニアの毒性と pH, 炭酸との関係. 東海水研報, 34, 67-74 (1962).
- 13) 柄多 哲, 丹下勝義: 有機性懸濁物によるガザミの種苗生産研究—VI, ソエア幼生に対するアンモニアの急性的毒作用. 兵庫水試研報, 18, 67-69 (1978).
- 14) 馬渡健二, 平山和次: 水産生物幼生の無機態窒素に対する抵抗力の成長にともなう変化. 長崎大産研報, 39, 1-6 (1975).