ワムシ高密度培養系におけるバクテリアの挙動と制御

田 中 賢 二

近畿大学九州工学部生物環境化学科

Behavior and Control of Bacterial Flora in High Density Culture of Rotifer

Kenji Tanaka

Department of Biological and Environmental Chemistry, Kyushu School of Engineering, Kinki University, Fukuoka 820-8555, Japan

近年、海産小型ワムシ（いわゆる S 型ワムシ、以下ワムシと称す）*Brachionus rotundiformis* の培養方法として、餌料用微細藻類を濃縮して給餌する高密度培養法が開発され、その生産効率は飛躍的に向上した。最近ではさらに生産効率を高めるために濃縮酸素ガスの通気や pH 制御、自動給餌装置や連続培養装置、懸濁物の除去装置等が導入あるいは開発され、10,000 個体/mL 以上という高密度での培養が可能となっている。¹⁻⁵⁾

一方でワムシの培養水は、餌料の残滓物や残餌、ワムシの排泄物等によって有機・無機化合物によって通常環境海水よりも極度に富栄養化している。このため、通常ワムシの培養水には、培養方法や餌料によっても異なるが、1 mL あたり $10^6 \sim 10^8$ 個程度の細菌が存在し、培養されたワムシ自身も 1 g あたり $10^7 \sim 10^8$ 個もの細菌を保有しているとされ、⁶⁻⁹⁾ 研究者によってはこれを大きく上回る細菌数が報告されている。¹⁰⁾ 中でもビブリオ属細菌はワムシ体内から高い割合で検出されており、それらの細菌が種苗生産過程における仔稚魚の疾病に関与している可能性も指摘されている。ワムシ高密度培養系での細菌群の挙動を解明し、これを好ましい状態に制御することができれば、有害細菌による汚染の少ない健全なワムシを効率的に生産することが可能となり、疾病による仔稚魚生産の損失を抑止できるのではないかと期待される。

そこで、本研究では、実用規模の水槽を使ったワムシ高密度間引き連続培養における培養水と培養ワムシ中の細菌数と細菌フローラの構成を調べ、有害細菌汚染対策に何が必要かを考察した。さらに、福岡県栽培漁業公社の吉村らと共同で開発した連続換水培養システムを用いて 100,000 個体/mL を越える超高密度生産を実施し、細菌数低減への効果についても検討したので紹介する。

1) 高密度培養における細菌数の変化

1.0 m³ 水槽を使って pH 制御、酸素ガス通気、濃縮淡水クロレラを給餌することにより 10,000 個体/mL の高密度間引き連続培養を実施し、細菌数の経日変化を調べ

た。なお、高密度培養では培養水が発泡するため、菌数計測は培養水と発泡水の両方について実施した。培養水中では、Zobell 培地で計数した一般海洋性細菌が $10^7 \sim 10^8$ CFU/mL、TCBS 培地で計数したビブリオ属細菌が $10^2 \sim 10^5$ CFU/mL の範囲で推移した。細菌数の計数値は従来法で行われた低密度培養水中におけるそれと大差がなかった。これは、間引きによって培養水が毎日希釈され、その結果、細菌の栄養源となる有機質の蓄積量が少なくなることが大きな要因になっているのではないかと思われる。培養水上清の TOC 濃度は一時的に 60 ppm から 80 ppm を示すこともあったが、ほぼ 20~30 ppm 程度を保たれていた。ワムシ培養水中ではクロレラの残滓物や残餌、ワムシの排泄物などは培養水中でフロックを形成するが、これらは徐々に分解して細菌の栄養素になると思われる。このため、我々は水溶性化合物の蓄積量が少なくなるように、これらフロックをマットを使って培養槽外に極力除去している。また、給餌による一時的な酸素不足を避けるため定量ポンプを使って濃縮クロレラを少量づつ連続的に給餌するなどしているが、これも残餌の低減については水溶性有機物の抑制に役立っていると考えられる。

このように間引きによる高密度培養では、従来型の低密度培養に較べてワムシ密度が数十倍から 100 倍程度高くなっているにもかかわらず、培養水中の細菌数はそれほど増加していないように思われた。ただし、回分培養では細菌数が一桁から二桁多いとする報告もある。¹⁰⁾

一方で、発泡水中の細菌数は培養水のそれに較べると 1 桁から 2 桁程度高い値を示し、培養水中の細菌が泡沫分離作用により泡沫中に濃縮されていることがわかった。発泡水の発生量は培養水の数% (v/v)/day に過ぎないが、大量の発泡が培養水中の細菌数の減少に一役かっていることがわかった。高密度培養では大量の発泡がみられるときにワムシの増殖が良好であることが経験的に知られているが、この泡沫分離による除菌効果と因果関係があるのかもしれない。

2) ワムシ体内の細菌数と抗菌剤処理の効果

一方、ワムシの体内に存在する細菌数は非常に高い値を示した。収穫直後のワムシ、海水で洗浄したワムシ、さらに抗菌剤ニフルスチレン酸ナトリウム (NS) 10 ppm の入った海水に 4 時間浸漬したワムシについて、それぞれ体内の生菌数を計数したところ、一般細菌数は洗浄前は 6×10^{10} CFU/g 近い値を示したが、海水洗浄後は菌数は 1.2×10^9 CFU/g に減少した。10 ppm NS を用いた薬浴処理後では菌数はさらに 10^8 CFU/g に減少した。一方、ビブリオ属細菌数は洗浄前は約 10^8 CFU/g であったが、洗浄後は 1.5×10^7 CFU/g に減少し、薬浴処理で約 10^6 CFU/g に減少した。NS 濃度 2 ppm の薬浴処理では一般細菌、ビブリオ属細菌ともにワムシ体内の細菌数はほとんど減少しなかった。このように薬浴処理は生菌数を 2 桁程度しか減少させることができなかった。また、抗生物質の安易な使用は薬剤耐性菌の出現を招く危険性もあるので、ワムシ生産における細菌汚染対策としてはあまり適切でないと思われる。従って、ワムシ体内での細菌の増殖をいかにして未然に防ぐかが今後の課題と考えられた。

3) 細菌フローラの構成

培養水と発泡水ではともに一般細菌数は培養中にあまり増加しなかったのに対して、TCBS 培地で検出されたビブリオ属と思われる細菌の数は顕著に増加した。なお、TCBS 培地上のコロニーのほとんどは黄色で外観と大きさも同じであり、培地上で広がる傾向を示した。このことは、ビブリオ属細菌の多くは白糖分解性で、増殖が速い菌種であることを示している。高密度培養水から TCBS 培地で分離した細菌 8 株について形態観察、オキシダーゼ活性、NaCl 耐性、アミノ酸脱炭酸反応および糖資化性など種々の同定試験を行った。その結果、これらの菌株がすべてビブリオ属細菌であることを改めて確認し、その多くは *Vibrio alginolyticus* と推定された。*V. alginolyticus* は報告例は少ないものの、一部の海産魚に対して腹部膨満症やビブリオ病を引き起こす疑いがもたれている。また、今回の実験では検出されなかったが、魚類の病原菌としてよく知られる *V. anguillarum* の検出例も他の研究者によって報告されている。しかしながら、病原性の有無は、同じ種の細菌であっても株や生育環境、菌数、魚の種類や飼育環境によっても異なると思われる。魚病の原因菌として疑いの持たれている細菌種が検出されたからといって必ずしも稚仔魚に影響が生じるとは考えにくい。

4) 連続換水培養法による超高密度培養と細菌数の低減

我々はワムシ生産のさらなる効率化を図るため、水槽内に膜型ろ過装置を取り付けて、ワムシに強い毒性を示すアンモニアを培養系から除去することによって、より高い密度でのワムシ培養を可能にする連続換水培養シス

テムを開発した。このシステムでは細菌の栄養素となる水溶性の有機・無機化合物も除去できるので、細菌の繁殖を抑えられるのではないかと期待される。実際、このシステムを用いた回分培養試験では 5 日で約 160,000 個体/mL のワムシ密度が得られ、一方、ワムシ体内のビブリオ属細菌数を $10^3 \sim 10^4$ cells/g に抑えることに成功した。現在、種苗生産現場での実用化に向けてシステムの改良に取り組んでいる。

今回の研究で、高密度培養でも間引き培養法では、ワムシの細菌数は従来型の低密度培養と変わらないことがわかった。細菌数に影響を及ぼしている要因として、培養水中の水溶性化合物の濃度、とくに水溶性有機化合物の濃度が考えられ、その供給源としてクロレラ残滓物やワムシの排泄物に由来するフロックが考えられた。また、培養水の発泡による泡沫分離作用は培養水中の細菌数の抑制に寄与していることが示唆された。実際、培養水から水溶性化合物量を連続的に除去する連続換水培養システムを用いることにより、細菌汚染度の少ない健全なワムシを超高密度で効率よく生産することに成功した。ワムシ培養水から検出されたビブリオ属細菌の多くは *V. alginolyticus* と推察されたが、細菌を完全に同定するには分子生物学的手法の導入が不可欠と思われる。また、培養環境の変化が細菌数と細菌フローラの構成にいかなる変化をもたらすか定量的な解析が今後望まれる。

文 献

- 1) 吉村研治, 宮本義次, 中村俊政. 濃縮淡水クロレラ給餌によるワムシの高密度大量培養. 栽培技研 1992; 21: 1-6.
- 2) 吉村研治, 北島 力, 宮本義次, 岸本源次. 濃縮淡水クロレラ給餌によるシオミズツボワムシの高密度培養における増殖阻害要因について. 日水誌 1994; 60: 203-213.
- 3) 吉村研治, 岩田 剛, 田中賢二, 北島 力, 石崎文彬. 非解離アンモニア抑制のための pH 制御によるシオミズツボワムシの高密度培養. 日水誌 1995; 61: 602-607.
- 4) 吉村研治, 大森庸子, 吉松隆夫, 田中賢二, 石崎文彬. 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 1996; 62: 897-903.
- 5) 吉村研治, 臼杵考志, 吉松隆夫, 田中賢二, 石崎文彬. 海産小型ツボワムシの高密度培養における懸濁物質の定量とその除去. 日水誌 1997; 63: 912-919.
- 6) 林 孝市郎, 木村俊夫, 菅原 庸. 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クマミジンコの細菌汚染. 三重大水産学部研報 1975; 2: 81-91.
- 7) 宮川宗記, 室賀清邦. シオミズツボワムシ *Brachionus plicatilis* の細菌叢. 水産増殖 1988; 35: 237-243.
- 8) 福所邦彦・平山和次編. 初期餌料生物—シオミズツボワムシ, 恒星社厚生閣, 東京, 1989; 34-36.
- 9) 福所邦彦・平山和次編. 初期餌料生物—シオミズツボワムシ, 恒星社厚生閣, 東京, 1989; 205-208.
- 10) 臼杵考志, 吉村研治, 吉松隆夫. 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 1998; 46: 193-201.