

## 第2章 イタヤガイの幼生飼育に関する研究

二枚貝養殖を行うためには、海中の浮遊幼生を人為的に付着させ種苗とする天然採苗技術や採卵から一貫して人為的に稚貝を生産する人工種苗生産技術により種苗を確保することが必須である。

イタヤガイの養殖は島根県で、1980年より天然採苗で得られた稚貝を用いて始まった<sup>17)</sup>。しかし、天然採苗数は、1982年に546万個を記録した後急減した<sup>11)</sup>。そこで、1989年からは島根県水産技術センター栽培漁業部で稚貝の人工種苗生産が行われた<sup>44)</sup>が、人工種苗生産を事業化するに当たっては、生産を安定させるための技術開発が必要となった。

自然環境下ではイタヤガイ浮遊幼生の最高密度は10個体/m<sup>3</sup>程度である<sup>45)</sup>。天然採苗に至るまでの稚貝の生残や成長の制限要因は、餌料となる植物プランクトンの量や着底基質の特性、捕食者の量、水温や塩分などの自然環境要因の変動が考えられる<sup>46)</sup>。しかし、人工種苗を生産するために人為的環境下で浮遊幼生が高密度飼育された場合には、飼育水の物理化学的な性質の変化や<sup>47-49)</sup>、ウイルス・細菌感染などの自然環境下ではそれほど重要視されない要因が主な幼生の減耗要因となる<sup>46, 50-63)</sup>。その対策として飼育水の濾過処理や紫外線照射、オゾン処理、薬剤の散布などの物理化学的方法により病原性微生物(細菌、ウイルス)を含めたすべての微生物を対象とした無選択的な除去、あるいは微生物数の低減を実施しているのが現状である<sup>64-68)</sup>。しかし、現状では微生物数のある程度の低減は可能であっても、完全に微生物を除去した無菌環境の創出は不可能であり、また一過的な微生物数の低減はその反動で時に幼生に悪影響を与える細菌の増殖を招くこともあり<sup>69, 70)</sup>、事実上、幼生に悪影響を与える微生物学的要因の完全な除去は不可能である。

最近、このような無選択的な微生物の除去に代わり、免疫学や生態学を意識した生物学的な手法の開発が1つの方向として脚光を浴びつつある。例えば、甲殻類のガザミ幼生飼育において、単菌種細菌の接種は安定した成果を得るのに有効であるとの報告がある<sup>71, 72)</sup>。この手法の有効性は細菌細胞自体が餌となり栄養状態を向上させる効果とともに、一般に飼育生物に悪影響を与えるとされる *Vibrio* に分類される細菌群の増加を抑制することにあるとされている<sup>71, 72)</sup>。この手法は生物学的制御、すなわち生物を

用いた生物の制御を意味するバイオコントロールの1つと定義され、水産増養殖ではこの例のみが実用化に至っている。バイオコントロールは植物生産分野で考案された手法であり、天敵微生物利用による害虫防除、あるいは拮抗微生物、弱毒ウイルス利用による病害防除などの手法が実践されている<sup>72)</sup>。

このバイオコントロールの概念に基づいて、健苗性すなわち生残および成長の良い幼生を得る手法を開発するために、以下の2点に着目して、幼生の人工飼育時に制御すべき主な事象を考えた。すなわち、(1) 幼生が抵抗力を獲得する条件：悪影響を与える要因に対して、幼生は抵抗力を高めることにより健苗性が高くなるが、この抵抗力上昇は環境中の生物学的な要因に幼生が感作されることも大きなウェイトを占めている。二枚貝類の幼生飼育環境は動物プランクトンである幼生と微生物である細菌で形成されているマイクロコズムと考えられることから、飼育水中の細菌相の動態は幼生の抵抗力の形成に重要な役割を持つと考えられる。(2) 幼生の飼育環境下において、悪影響を与える生物学的要因の抑制を行う。この主な生物学的要因として、飼育水中の細菌の動態が考えられる。例えば、無処理水中では滅菌処理水中と比較して数種の病原菌の消失が著しいという報告等がある<sup>73, 74)</sup>。これは滅菌処理水では細菌の絶対数が少なく、安定した細菌相が形成されていないため細菌相が変化しやすいのに対し、無処理水中では安定した細菌相が形成されており、飼育に悪影響を与える細菌群が急激には増殖し得ない状態が形成されているためと考えられている。

以上のことから、二枚貝の幼生飼育において幼生の生残および成長に最も大きな影響を与えているのは、飼育水中の細菌相の動態であると捉えバイオコントロールの対象は特定細菌種ではなく総体的な細菌相にあると考えた。

そこで本章では、仮説の妥当性を確認するため、まず飼育水の濾過、殺菌処理の違いによる細菌数および細菌のコロニー組成と幼生の生残、成長を観察し、飼育水の濾過、殺菌処理の違いによる細菌の数的、質的な変動が幼生に及ぼす影響を考察した。次に、幼生の生残、成長が良い飼育水の換水法を取った系と悪い換水法を取った系の水中の細菌数と細菌相の変動を観察し、それらの動態が幼生に及ぼす影

響について考察した。

## 1 イタヤガイ幼生飼育において飼育水中に出現する細菌の数量的変動と幼生に及ぼす影響

二枚貝の幼生飼育時の減耗要因として飼育水中の病原菌が引き起こす疾病<sup>50, 51, 75, 76)</sup>、および飼育水中に多量に増殖した細菌による悪影響<sup>64, 70)</sup>が報告されている。とくに後者の場合、マガキ *Crassostrea gigas* で、飼育水の前処理法により、細菌の増殖が顕著に異なり、飼育水として用いられない場合があるとされている<sup>70)</sup>。しかし、イタヤガイ科の幼生飼育では未だ検討されていない。

そこで、本節ではイタヤガイの幼生飼育に適した海水の処理法を検討するため、処理法の異なる海水で飼育したときの飼育水中における生菌数の変動を観察し、それが幼生に及ぼす影響について考察した。

### 1.1 材料および方法

#### 1.1.1 幼生飼育

本試験で使用する幼生はイタヤガイ母貝を温度刺激し、卵および精子を放出させた後、孔径 1 $\mu$ m のカートリッジ・フィルターで濾過した海水中で、受精および発生させることにより得た。受精の際には、自家受精を避けるようにした。第 1 回目の試験では、幼生をトロコフォアの段階で、あらかじめ以下に述べる処理海水を 1 槽ずつ満たした 500L 円型黒色ポリエチレン水槽中に 2 日後に收容した。第 2 回目の試験では、以下に述べる 1 $\mu$ m 簡易濾過海水を満たした水槽に收容して、3 日間飼育した後、2 つの試験区にほぼ等量ずつ分割した。收容密度は、第 1 回目の試験では 0.8 ~ 1.2 個体 /ml、第 2 回目の試験では 1.4 および 1.6 個体 /ml であった。

飼育水は第 1 回目の試験では、島根県水産技術センター浅海グループの二次濾過器（東京久栄、孔径 40 $\mu$ m）を通過した海水を、(1) 精密濾過器（日本濾水機、P-81 型、孔径 0.4 $\mu$ m）で濾過した海水（以下 0.4 $\mu$ m 濾過区と略す）、(2) 0.4 $\mu$ m 濾過水をさらに紫外線流水殺菌機（千代田工販、フロンライザー、照射管 2 本）に通過させた海水（以下紫外線区と略す）、(3) 孔径 1 $\mu$ m の簡易型カートリッジ・フィルター（東洋濾紙）で濾過した海水（以下 1 $\mu$ m 濾過区と略す）を用いた。また、第 2 回目の試験では、1 $\mu$ m 簡易濾過海水と 3 $\mu$ m の簡易カートリッジ・フィルター（東洋濾紙）で濾過した海水（以下 3 $\mu$ m 濾過

区と略す）を用いた。

飼育水は 2 日ごとに半量を交換した。また、毎日水槽底を観察し、斑状の幼生の沈積の有無とその程度を確認した。幼生の沈積は、サイフォンで取り除くとともに、多量に沈積した日は換水を行った。飼育水温は室温調節により、20 $^{\circ}$ C 前後に保ち、室内はブラインドで遮光した。餌料は *Pavlova lutheri* および *Isochrysis galbana* を 1 日 1 回、培養液とともに混合投与した。

飼育期間中、幼生の浮遊密度と殻長の測定を、2 ~ 4 日に 1 回行った。浮遊密度は各水槽の通気点付近の飼育水を 100ml 採取し、その中に含まれる幼生数を計測した。殻長の測定は、幼生 30 個体について、接眼マイクロメーターを用いて行った。

なお、これらの試験は、1993 年 1 月から 2 月にかけて行った。

#### 1.1.2 細菌分離用培地の調整

飼育水中の細菌を分離、培養するため、培地として ZoBell-2216 E 培地、およびこの培地を Table II-1-1 に示すように改変した培地（以下 ZoBell 改変培地と略す）を用い、両培地に常法により飼育水を希釈、塗布した後、20 $^{\circ}$ C の恒温器中で 10 日間培養し、出現した生菌数を比較した。

#### 1.1.3 飼育水中からの細菌分離、培養および計測

飼育水中からの細菌分離は、毎日、換水前に常法により行い、20 $^{\circ}$ C の恒温器中で 10 日間培養した。生育したコロニーは、(1) 白色または真珠色、(2) 白色で小さく、虫ピンの頭大、(3) 黄色、(4) 透明、(5) その他、の 5 型に区分して計数した。

### 1.2 結果

#### 1.2.1 細菌分離用培地の選択

ZoBell-2216E 培地と ZoBell 改変培地で生菌数を比較した結果、ZoBell-2216E 培地では平均  $19.3 \pm 4.51$  個のコロニーが、ZoBell 改変培地では平均  $39.7 \pm 3.21$  個のコロニーが得られた。t 検定の結果、5% の水準で ZoBell 改変培地で得られた生菌数が有意に多かったため、飼育水中の生菌数の調査には、ZoBell 改変培地を用いた。

#### 1.2.2 飼育槽中の生菌数の変動と幼生の浮遊密度および殻長の変化

Fig. II-1-1 に示すように第 1 回目の試験では、貯

水終了3時間後、および貯水1日後の生菌数はいずれも $1 \times 10^3$ CFU/ml から  $1 \times 10^4$ CFU/ml の間であり、紫外線区が最も少なく、 $1\mu\text{m}$  濾過区が最も多かった。貯水2日後にはすべての区で生菌数が $10^4$ CFU/ml となったが、やはり紫外線区が最も少なく、 $0.4\mu\text{m}$  濾過区と $1\mu\text{m}$  濾過区はほぼ同じ値であった。幼生収容1日後には逆に紫外線区において生菌数が最も多くなり、 $1\mu\text{m}$  濾過区が最も少なくなった。4日後には紫外線区が、5日後には $0.4\mu\text{m}$  濾過区が $10^5$ CFU/ml となり、10～11日後まで $10^5$ CFU/ml で生菌数が推移した。

一方、 $1\mu\text{m}$  濾過区では、生菌数が $6 \sim 9 \times 10^4$ CFU/ml の間で推移した。Fig. II-1-2 に示すように培地上のコロニーの性状は、 $1\mu\text{m}$  濾過区では、飼育期間を通じて白色で虫ピンの頭大のコロニーが60%以上を占めた。紫外線区では、幼生収容1日後以降、白色で虫ピンの頭大のコロニーと白色または真珠色のコロニーの割合がほぼ等しく、5日目以降に透明なコロニーがわずかに出現した。 $0.4\mu\text{m}$  濾過区は紫外線区とほぼ同様な傾向を示したが、5日目以降透明なコロニーが著しく増加した。なお、透明なコロニーをBTB テイポール培地で培養したが、発育しなかった。

水槽底に形成された幼生の斑状の沈積は、飼育水中の生菌数が、 $10^5$ CFU/ml となり、透明なコロニーが出現、増加した日以降に多く観察される傾向があった。なお、紫外線区では収容6、7日後、 $0.4\mu\text{m}$  濾過区では6、7と9、10、11日後であり、 $1\mu\text{m}$  濾過区では観察されなかった。

Fig. II-1-3 に示すように幼生の浮遊密度は、 $1\mu\text{m}$  濾過区と紫外線区が飼育開始から4日後にかけて減少したが、それ以降は6日後に増加した後、再び緩やかに減少した。なお、紫外線区で、飼育当初は幼生が水槽底に着底または直上に多く分布していたため、飼育当初の浮遊密度より後半の浮遊密度が高くなった。 $0.4\mu\text{m}$  濾過区では、飼育開始当初から水槽底近辺に分布している幼生が多かったため、浮遊密度は当初から低く、その傾向は6日後まではほとんど変化しなかったが、それ以降減少し、最終的にはほぼ全滅した。幼生の成長は3区ともほとんど変わらなかった。

Fig. II-1-4 に示すように第2回目の試験では、幼生収容1日後に $1\mu\text{m}$  濾過区の生菌数は $10^5$ CFU/ml であったが、 $3\mu\text{m}$  濾過区は $10^4$ CFU/ml で低かった。 $1\mu\text{m}$  濾過区では、3日目以降生菌数は減少し、 $10^4$ CFU/ml

で推移した。一方、 $3\mu\text{m}$  濾過区では逆に増加し、4日目以降 $10^5$ CFU/ml で推移した。

培地上のコロニーの性状は、両区とも、飼育開始当初は白色または真珠色のコロニーが優占したが、次第に白色で虫ピンの頭大のコロニーの出現割合が増加した。また、黄色のコロニーは、両区で観察されたが、 $3\mu\text{m}$  濾過区で、4日目以降出現割合の増加が著しかった。

水槽底への幼生の斑状の沈積は、 $3\mu\text{m}$  濾過区で生菌数が $10^5$ CFU/ml 以上となり、黄色のコロニーの出現割合が増加した、4日目以降に数回観察された。

幼生の浮遊密度は、 $1\mu\text{m}$  濾過区では、第1回目の試験と同様、飼育開始から6日後にかけていったん減少した後9日後にかけて増加し、以降は再び減少した。 $3\mu\text{m}$  濾過区では飼育開始当初から緩やかに減少し続けた。幼生の成長は、両区でほとんど変わらなかった。

### 1.3 考察

飼育水の濾過、殺菌の程度により、幼生収容後の生菌数およびコロニーの性状が異なることがわかった。すなわち、孔径 $0.4\mu\text{m}$  で濾過を行うか、その後紫外線照射し、人為的に細菌数を減少させた飼育水は、貯水当初は生菌数が少ないが、幼生収容後は急激に増加して、孔径 $1\mu\text{m}$  で濾過を行った飼育水中の生菌数より多い状態で安定し、出現したコロニーの性状も異なった。また、孔径 $3\mu\text{m}$  で濾過した飼育水中の生菌数は、幼生収容当初は孔径 $1\mu\text{m}$  で濾過した飼育水中の生菌数より少なかったが、それ以降 $1\mu\text{m}$  濾過では生菌数は徐々に減少した後に安定した。これに対し、 $3\mu\text{m}$  濾過では徐々に増加した後に安定し、やはりコロニーの性状が異なった。一方、幼生の沈積は生菌数が $10^5$ CFU/ml となり、かつ特徴的なコロニーが増加した時に多く観察される傾向があった。

Garland ら<sup>70)</sup> は、孔径 $0.2\mu\text{m}$  のメンブラン・フィルターで濾過した飼育水中の生菌数が急増する原因として、濾過後の飼育水中に含まれる細菌相が単純になり、細菌間で競合が起こりにくくなるので細胞数を急激に増加させる種が出現しやすいのではないかとしている。今回観察された幼生の浮遊密度の低下や死亡の原因も、飼育水中の生菌数が急激に増加し、その状態で推移したために幼生が悪影響を受けたのではないかと思われる。また、幼生の浮遊密度の低下や死亡が観察された飼育水中には特定の性

状のコロニーの出現が急増する傾向があったが、増加したのは第1回目と第2回目の試験で全く異なる色素を産生するコロニーであったので、特定の病原性を持つ細菌が増加したとは考えられない。

また、従来の幼生飼育例<sup>77)</sup>では、0.4 $\mu$ m 濾過または濾過後紫外線照射した飼育水を用いた場合は、本試験と同様、孔径1 $\mu$ m や3 $\mu$ m で濾過した飼育水を用いた場合に比べて、幼生の生残率が悪い場合が多かった。しかし、1 $\mu$ m で濾過した飼育水による飼育と3 $\mu$ m で濾過した飼育水による飼育では今回の試験と異なってほとんど差異がみられなかった。したがって、前述した幼生飼育方法で、浅海グループの前面海域において取水された海水を用いる場合には、孔径1 $\mu$ m の簡易カートリッジ・フィルターで濾過した海水を用いれば、再現性の良い幼生飼育が可能であると考えられる。ただし、この方法が適用されるのは、浅海グループの取水と同程度の細菌性状の海水が得られ、かつ病原菌の混入がない場合に限られると考えられる。取水する海域や時期によっては、イタヤガイ幼生に悪影響を及ぼす細菌の混入の可能性があるため<sup>75)</sup>、今回の方法が必ずしも適用できるとは考えられない。病原性細菌による被害の防止には、飼育水の紫外線照射、および無菌餌料の投与および環境中の細菌数の低減が有効とされるが<sup>78)</sup>、これらの処理を行った場合に今回の実験で紫外線区で観察されたように、逆に生菌数が急増し、幼生に悪影響を与えることも考えられる。そこで、病原性細菌の混入を防止すると同時に生菌数を抑制するためには、濾過後、静菌化の措置をとる必要がある。飼育水へ抗生物質を添加して幼生が飼育されており<sup>78)</sup>、イタヤガイ幼生飼育においても実験的には幼生の成長および生残に効果がみられたが<sup>79)</sup>、耐性菌の出現や、作業員への影響が懸念されるため、最善の方法とは考えられない。したがって、飼育水中に含まれる細菌組成を人為的に制御できるような、海水の処理技術や幼生の飼育技術を開発する必要がある。また、これらの技術を開発する上で、飼育水中の生菌数の増加が幼生に与える影響、および細菌の組成や菌数の安定する機構に不明な点が多いので、これらの解明が必要であると考えられる。

## 2 飼育水中の細菌相の動態が幼生の生残および成長に与える影響

### 1 節の試験結果で起こった幼生の浮遊密度の低下

や斃死が観察された原因は、飼育水中の生菌数が急激に増加し、その状態で推移したために幼生が悪影響を受けたのではないかと考えられた。また、幼生の浮遊密度の低下や斃死が観察された飼育水中には特定の性状のコロニーの出現が急増する傾向があったが、急増したコロニーの特徴は試験回次により異なったことから、特定の細菌ではないと考えられた。しかしながら、二枚貝の幼生飼育において経時的に飼育水中の細菌相全体の動態と幼生の生残および成長との関連性を検討することは大変な労力を要するため、詳細な検討は行われておらず、微生物学的に良好な飼育環境は把握されていない。

そこで、本節では、飼育水中の細菌相全体の動態が二枚貝幼生の生残や成長に及ぼす影響を明らかにするため、イタヤガイ浮遊幼生の飼育において、常に幼生の成長や生残が低いとされている連続換水飼育と、成長や生残が比較的良い止水換水飼育<sup>80)</sup>における飼育水中の細菌動態を、浮遊幼生の成長および生残状況と共に調べ、水中細菌相の変化が浮遊幼生の成長や生残に及ぼす影響を推定した。

## 2.1 材料および方法

### 2.1.1 幼生飼育

イタヤガイの母貝には、採卵前まで島根県松江市島根町野井地先で海中垂下していた個体を用いた。試験に供した幼生は、種苗生産マニュアル<sup>81)</sup>に記載した操作により得た。

幼生の飼育に供した餌料は、ハプト藻類 *Isochrysis galbana*, *Pavlova lutheri* および珪藻類 *Chaetoceros gracilis* の計3種である。培養に用いた保存株は、単種培養種であるが無菌ではなかった。培養はES 改変培地<sup>81)</sup>を所定量添加した滅菌海水を5L容の三角フラスコに入れ、これに保存株を接種し、エアポンプにより0.2 $\mu$ m メンブレン・フィルターで濾過した空気を餌料が活発に攪拌される程度に通気した。また、培養温度は室温調節により *Isochrysis galbana*, *Pavlova lutheri* は20℃、*Chaetoceros gracilis* は24～25℃に保持した。なお、餌料としては対数増殖期から定常初期までの状態のものを用いた。

本試験では、流水系と止水系の2つの換水方法により幼生飼育を行い、この2条件における全生菌数および細菌相を構成する属組成の変化を調査し、それがイタヤガイ幼生の生残および成長に与える影響を検討した。飼育水は水産技術センター浅海グルー

プ庁舎より 100m 沖合の底層から取水した海水を、砂濾過により 60 $\mu$ m 以上の粒子を除去した後、繊維濾過で 20 $\mu$ m 以上の粒子を除去し、さらに孔径 1 $\mu$ m のアドバンテック社製ポリプロピレンフィルターで濾過した海水を使用した。Fig. II-2-1 に示すように流水系は貯水・加温槽と飼育槽とを設け、チタンヒーターで飼育水と同水温に加温した貯水・加温槽内の海水を飼育水全量が 1 日に 1 回交換する程度の速度で飼育槽に流入させた。

止水系は貯水槽に 1 日貯水し、室温で加温することにより飼育水と同水温とした海水を 2～3 日毎に 1 度、半量をサイフォンで排水した後、貯水槽の海水を水中ポンプで注水することにより換水した。両系とも幼生が排水と共に排出されないように、流水系では排水孔に幼生より小さい目合いのネットを貼り付けた容器を装着し、止水系では同様の容器でサイフォンの排水を受け、幼生を回収した。飼育水槽は 500L 容ポリエチレン製円型水槽を用い、幼生収容密度は約 1.2 個体/ml、飼育水温は室温調節により全飼育期間を通して 20  $\pm$  1.6 $^{\circ}$ C に保持した。なお止水系では、飼育 8 日目に目合い 100 $\mu$ m のネットで幼生を選別するとともに水槽交換および全換水を行った。餌料種は 7 日目まで *Isochrysis galbana*, *Pavlova lutheri*, 7 日以降 *Isochrysis galbana*, *Pavlova lutheri* および *Chaetoceros gracilis* を等量ずつ混合して用いた。給餌および換水は種苗生産マニュアル<sup>81)</sup>を参考に行った。投餌量は幼生の成長に合わせて 1 日 1 回、餌料培養液とともに飼育水中の餌料プランクトンの細胞密度が 10<sup>3</sup>～10<sup>4</sup> cells/ml となるよう培養液とともに投与した。なお、培養液の量は飼育水槽容量の 0.1% 程度であった。なお、流水系では飼育水の流出による餌料の損失を補うため、貯水槽にも同量の餌料を添加した。止水系は、換水を 2 日または 3 日毎に 1 度、半量行い、また毎日水槽底を観察し、肉眼で観察できる幼生の沈積の有無を確認した。幼生の斑状の沈積を認めた場合は沈積した幼生をサイフォンで取り除いた。

なお、幼生の浮遊密度は、飼育水槽の通気部付近の水を 100ml 採水し、その中に含まれる幼生数を計測することにより推定した。また、殻長は、浮遊密度を計測した後の幼生のうち 30 個体を無作為に測定した。浮遊密度の測定は 1 日 1 回、殻長の測定は 2～3 日毎に 1 回行い、細菌相調査は使用する直前の飼育水、飼育水槽へ投入する直前の孵化水、止水系における使用直前の換水用水、および、流水系に

おける飼育開始から 3 日間の換水用水について行った。さらに、飼育開始から 13 日目までの両系の飼育水を対象として 1 日 1 回細菌相調査を行った。

## 2.1.2 細菌相調査

海洋細菌の分離および計測には ZoBell-2216E 平板培地を用いた<sup>82)</sup>。調査対象とした幼生を含む飼育水および孵化水は滅菌済み 40 $\mu$ m メッシュ付きピペットを用い、幼生を含まない換水用水および餌料培養液は滅菌済みピペットを用いて滅菌済みの試験管に採取し、これを試料原液とした。この試料原液を滅菌海水 9ml に試料 1ml を順次分注し希釈を行う、10 倍希釈法により適当な濃度に希釈した。

全生菌数の測定は各段階の希釈試料 0.1ml を 1 段階につき 3 枚の ZoBell-2216E 平板培地に塗抹して、20 $^{\circ}$ C で 7 日間培養し、具現化したコロニー数を計測し、その平均値を算出し CFU/ml (Colony Forming Unit /ml) として求めた<sup>82)</sup>。

また、コロニー組成は、コロニー数が約 20～200 個出現した各希釈段階の平板培地のコロニーを、形状と色調別に分類・計測し、異なるコロニーごとの百分率を算出してコロニー組成比 (%) として求めた。

## 2.1.3 海洋細菌の単離、培養、保存および属組成の測定

海洋細菌の単離は ZoBell-2216E 平板培地上に具現化したコロニーを釣菌することにより行った。得られた各菌株の培養および保存は ZoBell-2216E 高層培地を用い、継代培養は約 2 ヶ月に 1 度行った。属組成は平板上に具現化した全てのコロニーのうちコロニー組成を反映させた 50 菌株を釣菌し、その各菌株を絵面、清水の方法<sup>82)</sup>を一部改変し、Fig. II-2-2 に示した 1 次鑑別同定図式に基づき属決定を行い、属ごとの百分率を算出して属組成比 (%) として求めた。

同定試験は 1 次鑑別同定図式に従い、グラム染色試験、運動性試験、Oxidation-Fermentation (O-F) 試験、塩類要求性試験、DNA 分解性試験、発光性試験、オキシダーゼ試験および寒天分解性試験の計 8 項目を行った<sup>82,83)</sup>。各試験に用いた菌体は保存菌株の一部を ZoBell-2216E 斜面培地に移植し、20 $^{\circ}$ C、2～7 日間培養することにより得た対数増殖期から定常期に至る状態の新鮮培養菌体を用いた。各試験における操作は、沿岸環境調査マニュアル<sup>82)</sup>に記載され

た方法に従った。なお、鞭毛の有無および性状の判定は、運動性試験時に行った。

#### 2.1.4 多様性指数の算出

測定した属組成から、下記に示した各項目を算出し、式 (1)、(2) に従い多様性指数の 1 つである Shannon index を求めた<sup>84)</sup>。

$$I = \ln \frac{N!}{n_1! n_2! \cdots n_s!}, \quad N = \sum_{i=1}^S n_i \quad \dots\dots (1)$$

$$H' = \lim_{N \rightarrow \infty} \frac{I}{N} \simeq -\sum p_i \ln p_i, \quad n_i = p_i N \quad \dots\dots (2)$$

ここで  $I$  : 情報エントロピー

$N$  : 属分類した総菌株数

$S$  : 分類した属数

$n_i$  :  $i$  属に分類された菌株数

$H'$  : Shannon index

## 2.2 結果

### 2.2.1 幼生飼育

Fig. II-2-3 に浮遊幼生の密度と殻長の推移を示す。浮遊幼生の密度は、止水系では水槽交換および幼生の選別を行った飼育開始後 8 日目までほとんど変化がなく約 1.0 ~ 1.2 個体/ml の高い値で推移したのに対し、流水系では飼育初期から緩やかな減少が見られ、飼育開始後 4 日目以降は約 0.6 個体/ml の低い値で推移した。

また、流水系と比較して止水系では、飼育期間を通して常に幼生の成長が早く殻長も大きかった。止水系の幼生は、飼育開始後 7 日目には殻頂期となり、13 日目には約 50% が変態期に達し、平均殻長は  $218 \pm 24.9 \mu\text{m}$  であったのに対し、流水系では 9 日目にはほとんどの個体が D 型期であり、13 日目でも殻頂期と D 型期の幼生が混在し、平均殻長は  $148 \pm 30.5 \mu\text{m}$  であった。t 検定の結果、5% の水準で有意差があり止水系の幼生の殻長が大きかった。

### 2.2.2 細菌相の動態

Table II-2-1 に各海水・飼育水中の全細菌数および細菌組成を示す。飼育に用いた各海水の細菌学的な初期条件に関して、全細菌数は流水系に使用した使用直前の換水用水のみ  $10^2 \text{CFU/ml}$  であり、その他の海水は全て  $10^4 \text{CFU/ml}$  であった。また、各海水中の細菌組成は、使用直前の飼育水では *Moraxella* が、投入する直前の孵化水では *Pseudomonas* および

*Vibrio* が優占し、止水系に使用した使用直前の換水用水では *Moraxella* が優占するものとなった。流水系に使用した換水用水では、使用直前 (1 月 19 日) は *Moraxella* が優占したのに対し、2 日目 (1 月 20 日) には *Vibrio* が、3 日目 (1 月 21 日) には *Vibrio* および *Alteromonas* が優占する属組成となった。

次に、Fig. II-2-4 に飼育期間中における飼育水中の細菌数の経時変化を示す。飼育開始後の細菌相の動態であるが、図に示すように飼育水中の全生菌数は止水系および流水系とも幼生投入直前には  $1.2 \times 10^4 \text{CFU/ml}$  であり、止水系では飼育開始後 11 日目に、流水系では 12 日目にそれぞれ  $10^5 \text{CFU/ml}$  に達し、その後は両系とも  $10^4 \sim 10^5 \text{CFU/ml}$  で変動しており、ほぼ類似した変動傾向を示した。

一方、Fig. II-2-5 に示すように各系の細菌組成は、飼育結果に明確な差が見られた飼育開始後 5 日目までの間において、明らかに異なる変動パターンを示した。また、全飼育期間を通して、流水系では、止水系と比較して各属の占有率が大きく変動した。すなわち、流水系では飼育開始直後から 5 日目までの各属の比率は 1 日ごとに大きく変動した。また、飼育開始 5 日目以降では、止水系は *Vibrio*, *Pseudomonas*, *Moraxella*, *Cytophaga*, *Flavobacterium* の比率が一定となる安定性の高い状態で推移したのに対し、流水系では飼育日数の経過とともに属分類の不可能な菌株の増加とともに *Moraxella* が優占する多様性のない、単純な菌相に収束する様相を示した。

さらに、各系列の多様性指数を算出し、その変化から各系の細菌相の変動を検討した結果、Fig. II-2-6 に示すように止水系の多様性指数の変動幅は飼育期間を通して小さく、属組成の安定性が高かったのに対し、流水系の多様性指数の変動幅は飼育期間を通して大きく、属組成の安定性が低かった。

## 2.3 考察

二枚貝幼生の飼育不良の原因として、水中細菌の量的・質的变化を指摘する報告が多い。これらは、飼育水中の全生菌数の変化を重視した報告<sup>53-56)</sup>と、特定の細菌相の変化に注目した報告に分けられる。後者では *Vibrio* の影響を指摘した報告が圧倒的に多く<sup>57-60)</sup>、次いで *Aeromonas*<sup>61,62)</sup>、*Pseudomonas* の影響が報告されている<sup>63)</sup>。

しかし、これらの属は通常の飼育水中に存在する細菌相の構成属であり、健康状態が良好な幼生は常

に *Vibrio* や *Pseudomonas* を含めた多種の微生物を濾過摂食し、消化管内や組織にもこれらの細菌が存在していることが確認されている<sup>50)</sup>。従って、病原菌に属する細菌の存在が必ずしも感染を引き起こす原因にならないことは明らかである。一方、無処理海水中では、滅菌処理した海水中と比べ病原菌数の減少が短期間に生ずるという報告<sup>73)</sup>、また病原性を持つ特定の細菌が増加していない飼育環境においても幼生の生残に差が生じるという報告もある<sup>69)</sup>。これらの報告を総合すると、病原菌の消長に水中細菌相全体の変化が大きな役割を果たしている、すなわち、飼育水中における個々の細菌の消長ではなく、細菌相全体の動きが幼生の生残や成長に重大な影響を及ぼすものと推察される。

本研究においても、換水方法の違いにより、飼育開始後の飼育水中の全生菌数の変動には差異がみられなかったものの、細菌相を構成する属組成の変動は大きく異なった。すなわち、幼生の生残および成長が不良であった流水系では、飼育初期に各属の占有率が大きく変動しており、細菌相を構成する属組成の安定性が幼生の生残および成長に大きな影響を与える要因の一つであることが示唆された。

なお、流水系の幼生の生残および成長が不良であった原因には、換水の流入による物理的ストレスが関係している可能性もある。しかしながら、流水系では毎分あたり 0.3～0.4L の緩やかな連続換水であったのに対し、止水系では換水にあたって一時的にせよ毎分あたり約 10L の速度で急速な換水を行っており、換水による物理的ストレスは幼生に影響を与える要因であるとは考えられない。

両系の飼育水中細菌の属組成を詳しく観察すると、流水系では飼育中期から後期にかけて属分類の不可能な菌株の増加とともに、*Moraxella* のみが優占する単純な菌相に収束したのに対し、幼生の生残および成長が良好であった止水系では複数の属の比率がほぼ一定となる安定性の高い属組成が維持された。しかし、*Moraxella* は両系ともに存在していたことから、この属が幼生に直接の悪影響を与えているとは考えられない。止水系では複数の属からなる安定な細菌相が形成されていたことから、特定細菌群の影響を排除する緩衝的機能が働き、その結果、良好な幼生の生残および成長につながったものと推察される。

なお、止水系では飼育開始後 8 日目に、飼育水槽および飼育水の交換と幼生の選別を行ったが、その

前後の総生菌数および細菌相はほとんど変化しなかった。この原因は、交換に用いた海水は、1 日貯水したものであったので、飼育水槽内に安定した細菌相がほぼ形成されていたこと、および収容後の幼生密度の低下が観察されなかったことから、活力低下や死亡した幼生体内で特定の細菌群が増殖しなかったことによると考えられる。

一方、細菌を幼生の餌料として捉えると、細菌自体を構成する脂肪酸に二枚貝幼生にとっての必須脂肪酸は含まれていない<sup>76)</sup>が、細菌は幼生の成長に必要なビタミン類や、酵素などを含んでいるため、餌料とした微細藻類の補足的な栄養源となりうると考えられている<sup>76)</sup>。したがって、安定した水中細菌相の効果は、幼生にとって細菌学的に良好な環境状態を整えることと同時に、有効な餌料を供給することにあると考えられる。

近年、幼生にとって有益な単細菌種を投入することにより、良好な飼育成果を得る手法が報告されている<sup>85,86)</sup>。これらの報告では、細菌は幼生の餌料として有効であると報告されており、幼生に悪影響を与える細菌群に対する緩衝的機能については言及されていないことから、一概に特定細菌種が優占する細菌相を構築することが、必ずしも良好な飼育結果をもたらすとは限らず、水中の細菌組成を多様化し、安定性の高い状態に保つことが、二枚貝幼生を飼育する際の最も重要な要因であると考えられる。

### 3 *Nannochloropsis* sp. の飼育水への添加が幼生の成長や生残に及ぼす影響

2 節で述べたように、流水式飼育は幼生の浮遊密度の減少が著しく、成長も悪かった。この一因は、流水式飼育では飼育水中の細菌相の変動が著しいことにあると考えられ、佐藤ら<sup>87)</sup>はこの変動を緩和するため、魚介類の種苗生産でいわゆる「水作り」のために用いられている真正眼点藻類の *Nannochloropsis* sp. に注目し、その培養液の上清を飼育水に添加すると細菌制御効果が発現し、幼生の成長、生残が改善することを報告した。しかし、この方法は *Nannochloropsis* sp. の 10 万 cells/ml 相当の培養液の濾液を作成して毎日添加する必要があり、飼育現場では煩雑で実際的ではない。佐藤ら<sup>87)</sup>は *Nannochloropsis* sp. の 10 万 cells/ml を細胞ごとイワガキ幼生飼育水に添加したところ、幼生の浮遊密度が減少したことを報告し、原因として添加

した *Nannochloropsis* sp. の細胞が過剰であり、幼生の摂餌を妨げたためと推定している。また、*Nannochloropsis* sp. の培養液の添加濃度は、事前の予備実験により明確に細菌相に差異があると判断された濃度としているが、培養液上清の添加による細菌制御効果は、*Nannochloropsis* sp. の細胞の細胞外分泌物によるいわゆるアレロパシーによる部分が大いと考えられ、*Nannochloropsis* sp. の細胞を低密度で飼育水に添加し、それらの細胞が分泌物を持続的に分泌することで上清の添加と同様な効果が得られる可能性も考えられる。そこで、*Nannochloropsis* sp. の細胞を幼生の摂餌に障害が生じない範囲で培養液ごと飼育水に添加し、イタヤガイ幼生の生残や成長の改善を図る目的で試験を行った。

### 3.1 材料および方法

試験は、1997年12月4～15日までと1998年1月8～20日までの2回おこなった。飼育には、Fig. II-2-1と同様な流水式飼育装置（500L円形水槽使用）を用いた。飼育水は、島根県水産技術センター浅海グループ庁舎より100m沖合の底層から取水した海水を、砂濾過により60 $\mu$ m以上の粒子を除去した後、繊維濾過で20 $\mu$ m以上の粒子を除去し、さらに1 $\mu$ mのアドバンテック社製ポリプロピレンフィルターで濾過した海水を用いた。流量は毎分約400mlとし、24時間流水とした。

イタヤガイ母貝には、採卵前まで島根県松江市島根町野井地先で海中垂下していた個体を用いた。試験に供した幼生は、種苗生産マニュアル<sup>81)</sup>に記載した操作により得た。

幼生の飼育に供した餌料はハプト藻類の *Isochrysis galbana* と珪藻類の *Chaetoceros gracilis* を用いた。この2種の保存株は、単種培養であるが無菌ではなかった。培養はES改変培地を所定量添加した滅菌海水を5L容の三角フラスコに入れ、これに保存株を接種し、エアポンプにより0.2 $\mu$ mメンブラン・フィルターで濾過した空気を餌料が活発に攪拌される程度に通気し、培養温度は室温調節により、*Isochrysis galbana* は20 $^{\circ}$ C、*Chaetoceros gracilis* は24～25 $^{\circ}$ Cに保持した。なお、餌料としては対数増殖期から定常初期までの状態のものを扱い、標準量を飼育槽と貯水槽へ1日1回投入した。また、添加した *Nannochloropsis* sp. の培養法は、*Isochrysis galbana* と同様な方法で行った。

*Nannochloropsis* sp. は、イタヤガイ幼生で予備的に試験したところ、10,000cells/mlを超えて添加すると幼生の浮遊密度が大きく減少したので、5,000cells/ml添加する区（以下5,000細胞添加区と略す）と10,000cells/ml添加する区（以下10,000細胞添加区と略す）、および無添加のコントロール区（以下コントロール区と略す）の3区を設けた。水槽への添加方法は餌料と同様とした。但し、*Nannochloropsis* sp. を添加する区は、水槽に幼生を収容する前日にあらかじめ *Nannochloropsis* sp. を所定量添加した。また毎日水槽底を観察し、肉眼で観察できる幼生の沈積の有無を確認した。幼生の斑状の沈積を認めた場合は沈積した幼生をサイフォンで取り除いた。

なお、幼生の浮遊密度は、飼育水槽の通気部付近の水を100ml採水し、その中に含まれる幼生数を計数することにより推定した。また、殻長は、浮遊密度を計数した後の幼生のうち30個体を無作為に測定した。浮遊密度の測定は1日1回、殻長の測定は2～4日に1回行った。飼育水温は17 $^{\circ}$ Cから20 $^{\circ}$ Cの間であった。

### 3.2 結果

#### 3.2.1 1回目試験

Fig. II-3-1に幼生の浮遊密度の変化を示した。トロコフォアは1.9～1.7個体/mlの密度で収容した。幼生の浮遊密度は、コントロール区で飼育開始2日目に1.1個体/mlに急減し、6日目以降は飼育開始時のほぼ1/2の0.7～0.9個体/mlの密度で推移した。一方 *Nannochloropsis* 添加区では両区とも飼育開始以降緩やかに密度が低下し、5,000細胞添加区では12日目に1.0個体/mlと最低になったが、13日目に1.5個体/mlまで回復した。10,000細胞添加区でもやはり12日目に1.2個体/mlと最低となったが、13日目に1.5個体/mlまで回復した。

Fig. II-3-2に幼生の平均殻長の推移を示した。幼生の平均殻長は、飼育開始4日目には120.7～120.8 $\mu$ mで3槽ともほぼ同様であったが、7日目には5,000細胞添加区で146.9 $\mu$ m、10,000細胞添加区で143.8 $\mu$ m、コントロール区で141.4 $\mu$ mと、*Nannochloropsis* 添加区の方が大きくなった。この傾向は10日目以降も続き、13日目には、5,000細胞添加区で208 $\mu$ m、10,000細胞添加区で190.3 $\mu$ m、コントロール区で170.8 $\mu$ mと、*Nannochloropsis* 添加区の成長がコントロール区を上回り、平均値が等



しいかどうか検定を行ったところ、5,000細胞添加区とコントロール区、および10,000細胞添加区とコントロール区ではそれぞれ有意な差が認められた(t検定、 $p < 0.01$ )。また、*Nannochloropsis* 添加区の間でも平均殻長は5,000細胞添加区が10,000細胞添加区を上回り、平均値に有意な差が認められた(t検定、 $p < 0.01$ )。

### 3.2.2 2回目試験

Fig. II-3-1に幼生の浮遊密度の変化を示した。トロコフォアは1.0～1.6個体/mlの密度で收容した。幼生の浮遊密度は、コントロール区で飼育開始8日目に0.4個体/mlと最小密度を記録したが、それ以外は0.6～1.1個体/mlの密度で推移し、1回目試験のような大幅な減少は見られなかった。一方*Nannochloropsis* 添加区では両区とも飼育開始以降緩やかに密度が低下し、5,000細胞添加区および10,000細胞添加区では1.0～1.6個体/mlで推移した。

Fig. II-3-2に幼生の平均殻長の推移を示した。幼生の平均殻長は、飼育開始2日目には119.5～121.2 $\mu\text{m}$ で3槽ともほぼ同様であったが、4日目以降*Nannochloropsis* 添加区の方がコントロール区より殻長が大きくなった。12日目には5,000細胞添加区で平均殻長221.5 $\mu\text{m}$ 、10,000細胞添加区で213 $\mu\text{m}$ 、コントロール区で187.8 $\mu\text{m}$ と、*Nannochloropsis* 添加区の方が大きくなり、平均値が等しいかどうか検定を行ったところ、5,000細胞添加区とコントロール区、および10,000細胞添加区とコントロール区ではそれぞれ有意な差が認められた(t検定、 $p < 0.01$ )が、5,000細胞添加区と10,000細胞添加区では有意な差が認められなかった。

### 3.3 考察

この試験では、直接細菌数や細菌相の変動を観察せず、イタヤガイ幼生の生残と成長の差違により*Nannochloropsis* sp. 細胞の添加効果を推定した。*Nannochloropsis* sp. 細胞を5,000細胞添加した区と10,000細胞添加した区は、添加しなかったコントロール区と比較して幼生の成長が早く、浮遊状態が良いと考えられたことから、飼育水中の細菌相の制御は培養液を細胞ごと添加する方法でも可能と推定された。また、5,000細胞添加区と10,000細胞添加区と比較すると、浮遊密度は10,000細胞添加区でやや変動が少なかったが、平均殻長は、5,000

細胞添加区が10,000細胞添加区を上回ったので、*Nannochloropsis* sp. 細胞を5,000～10,000cells/mlの範囲で添加することで、幼生の成長、生残の改善が期待できると考えられる。

## 4 まとめ

飼育水の濾過、殺菌の程度により、幼生收容後の生菌数およびコロニーの性状が異なることがわかった。すなわち、孔径0.4 $\mu\text{m}$ で濾過を行うか、その後紫外線照射し、人為的に細菌数を減少させた飼育水は、貯水当初は生菌数が少ないが、幼生收容後は急激に増加して、孔径1 $\mu\text{m}$ で濾過を行った飼育水中の生菌数より多い状態で安定し、出現したコロニーの性状も異なった。また、孔径3 $\mu\text{m}$ で濾過した飼育水中の生菌数は、幼生收容当初は孔径1 $\mu\text{m}$ で濾過した飼育水中の生菌数より少なかったが、それ以降1 $\mu\text{m}$ 濾過では生菌数は徐々に減少した後に安定した。それに対し、3 $\mu\text{m}$ 濾過では徐々に増加した後に安定し、やはりコロニーの性状が異なった。一方、幼生の沈積は生菌数が $10^5$ CFU/mlとなり、かつ特徴的なコロニーが増加した時に多く観察される傾向があった。したがって、孔径1 $\mu\text{m}$ の簡易カートリッジ・フィルターで濾過した海水を用いることで、再現性の高い幼生飼育が可能である。

さらに、細菌の属まで査定し、飼育水中の細菌相の変動を観察した。その結果、幼生の生残および成長が不良であった系では、飼育初期に各属の占有率が大きく変動しており、細菌相を構成する属組成の安定性が幼生の生残および成長に大きな影響を与える要因の一つであることが示唆された。すなわち、幼生の生残および成長が不良であった系では飼育中期から後期にかけて属分類の不可能な菌株の増加とともに、*Moraxella* のみが優占する単純な菌相に収束したのに対し、幼生の生残および成長が良好であった系では複数の属からなる安定な細菌相が形成されていたことから、特定細菌群の影響を排除する緩衝的機能が働き、その結果良好な幼生の生残および成長につながったものと推察される。したがって、水中の細菌組成を多様化し、安定的な状態に保つことが、二枚貝幼生を飼育する際の最も重要な要因である。

飼育水中の細菌相を安定させる目的で、佐藤ら<sup>87)</sup>はイワガキ幼生を用いて、*Nannochloropsis* sp. の培養液を飼育水へ添加することにより良好な細菌相

を保つことができると報告した。この結果を基に人工種苗生産の現場で実行可能な手法として、*Nannochloropsis* sp. の細胞を直接飼育水へ添加してイタヤガイ幼生の成長や生残を観察したところ、*Nannochloropsis* sp. の培養液を細胞ごと 5,000 ～

10,000cells/ml の範囲で添加することでも同様な効果が期待できることが分かった。この手法は現在、イワガキの人工種苗生産にマニュアル化<sup>99)</sup>して取り入れられており種苗の安定供給に貢献している。

Table II-1-1 Composition of modified ZoBell's 2216 E medium for the isolation of bacteria from sea water used in the mass culture of bay scallop *Pecten albicans*.

Peptone	5 g
Yeast extract	1 g
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.1 g
Agar	15 g
Sea water	800 ml
Fresh water	200 ml
pH	7.6-7.8

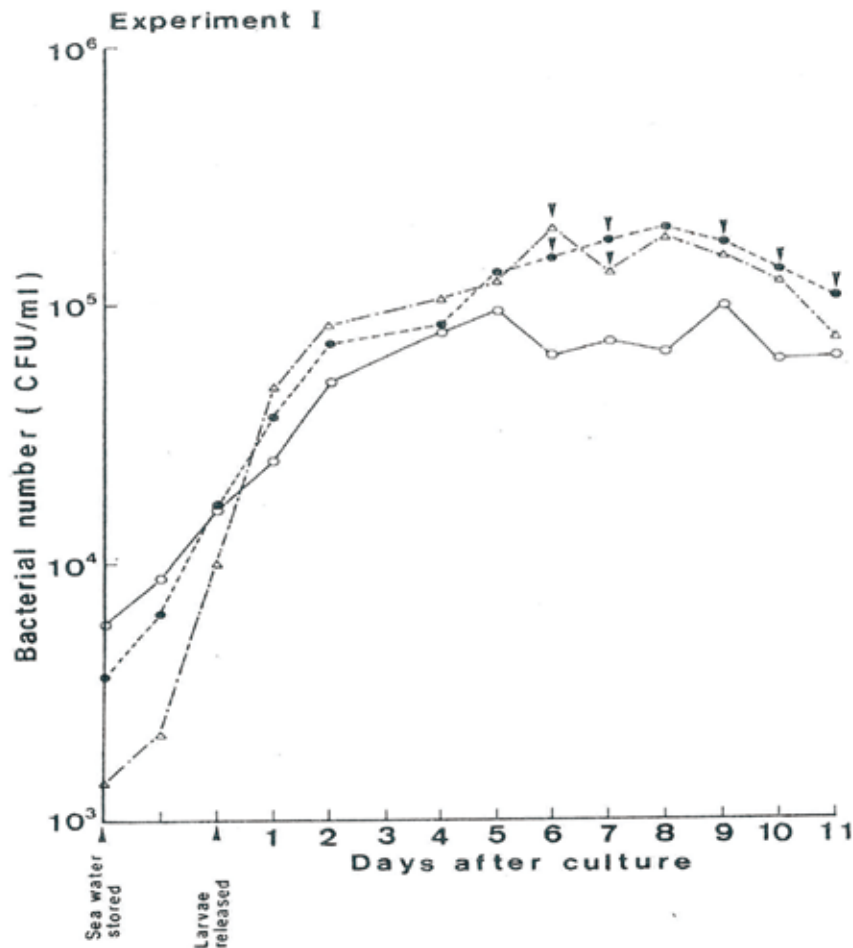


Fig. II-1-1 Changes in total bacterial counts in seawater of experiment I, used in the mass culture of bay scallop *Pecten albicans*. Open circles, 1 μm cartridge-filtered seawater; open triangles, 0.4 μm ceramic-filtered U. V. irradiated seawater; solid circles, 0.4 μm ceramic-filtered seawater; solid arrows, appearance of brown spots or patches at the bottom of the larval tank.

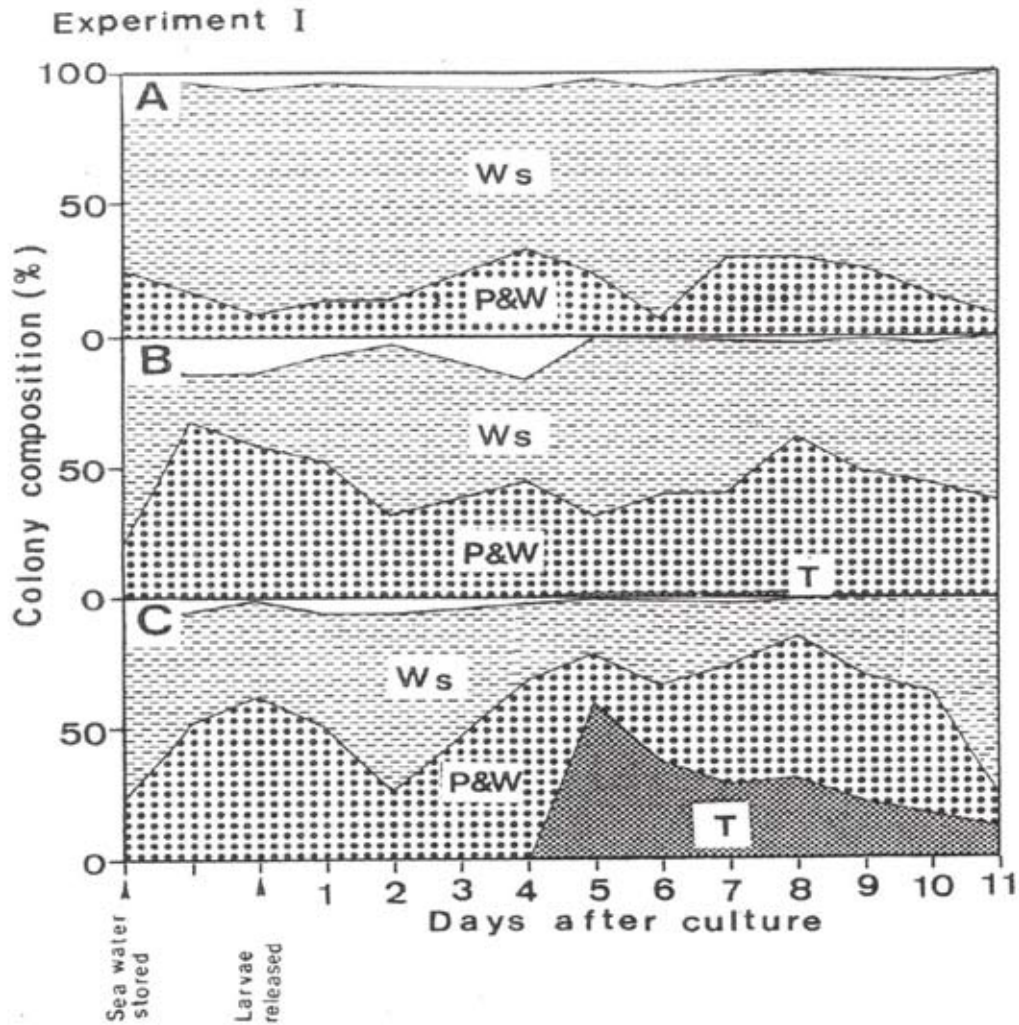


Fig. II-1-2 Changes in colony compositions of bacteria isolated from; A, 1  $\mu\text{m}$  cartridge-filtered; B, 0.4  $\mu\text{m}$  ceramic-filtered U. V. irradiated; C, 0.4  $\mu\text{m}$  ceramic-filtered seawaters of experiment I, used in the mass culture of bay scallop *Pecten albicans*.

Ws, pin-head like white colonies; P & W, pale and white colonies  
T, transparent colonies.

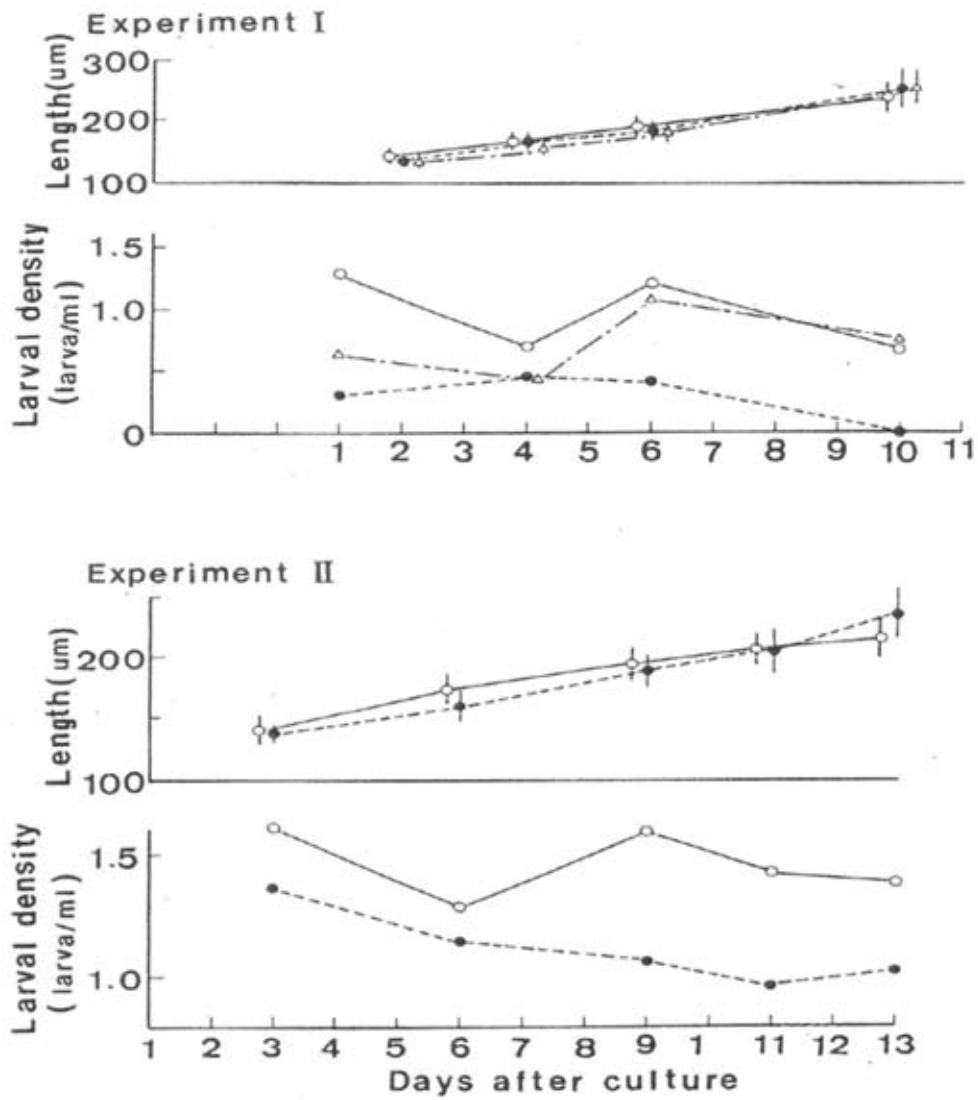


Fig. II-1-3 Growth and larval density in tanks of experiments I and II. Experiment I; open circles, 1 μm cartridge-filtered seawater; open triangles, 0.4 μm ceramic-filtered U. V. irradiated seawater; solid circles, 0.4 μm ceramic-filtered seawater. Experiment II; open circles, 1 μm cartridge-filtered seawater; solid circles, 3 μm cartridge-filtered seawater. Circles and vertical bars for growth represent mean value and S. D., respectively.

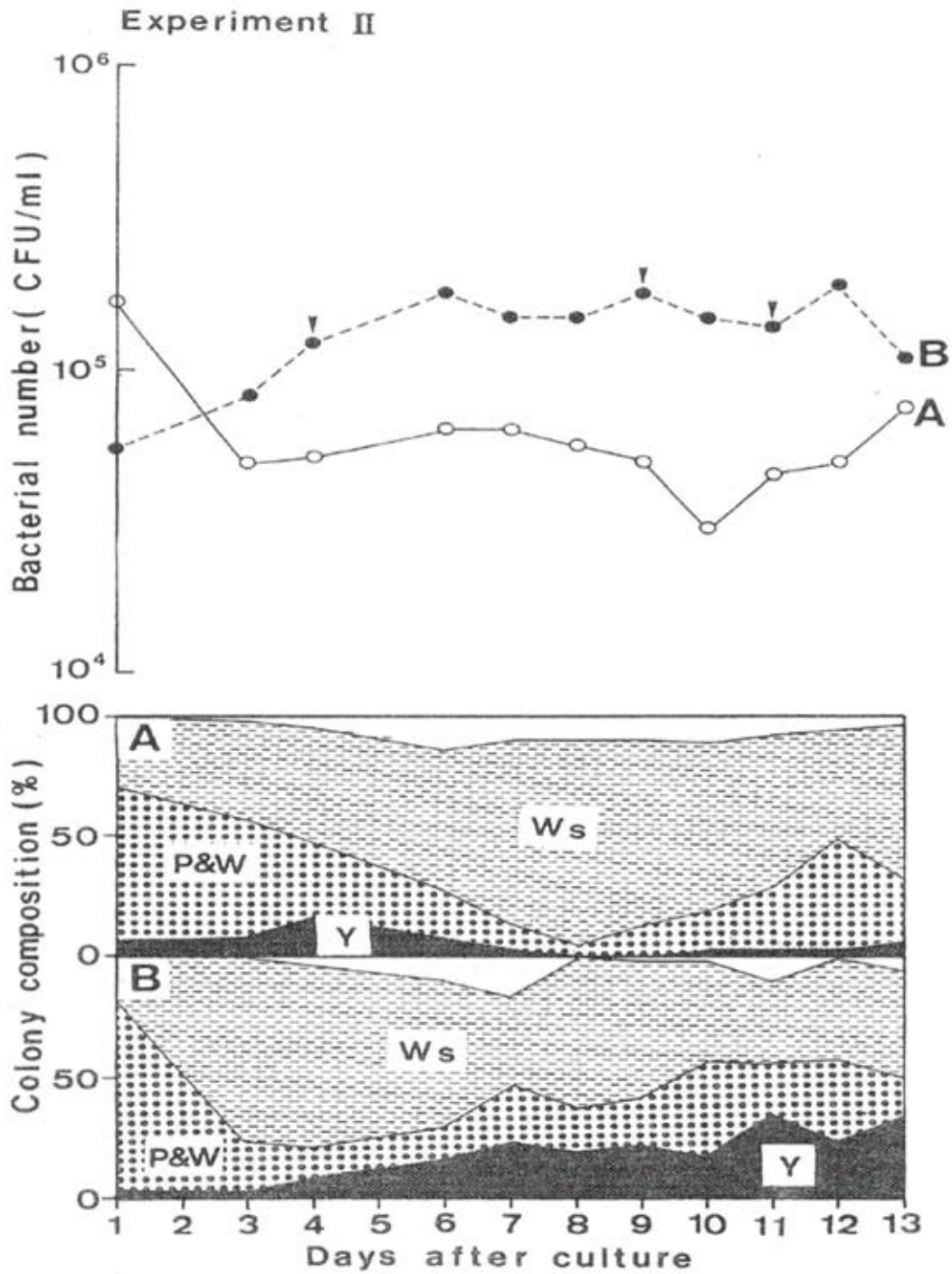


Fig. II-1-4 Changes in total counts and colony compositions of bacteria isolated from: A, 1  $\mu$ m cartridge-filtered seawater, and B, 3  $\mu$ m cartridge-filtered seawater of experiment II, used in the mass culture of bay scallop *Pecten albicans*. Ws, pin-head like white colonies; P & W, pale and white colonies; Y, yellow colonies; solid arrows, appearance of brown spots or patches at the bottom of the larval tank.

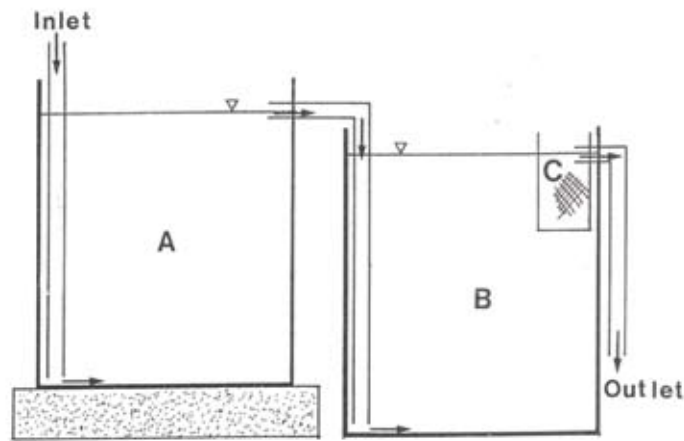


Fig. II-2-1 Schematic diagram of flowing water system.

A: storage and heating tank

B: culture tank

C: sieve

→: flow of sea water

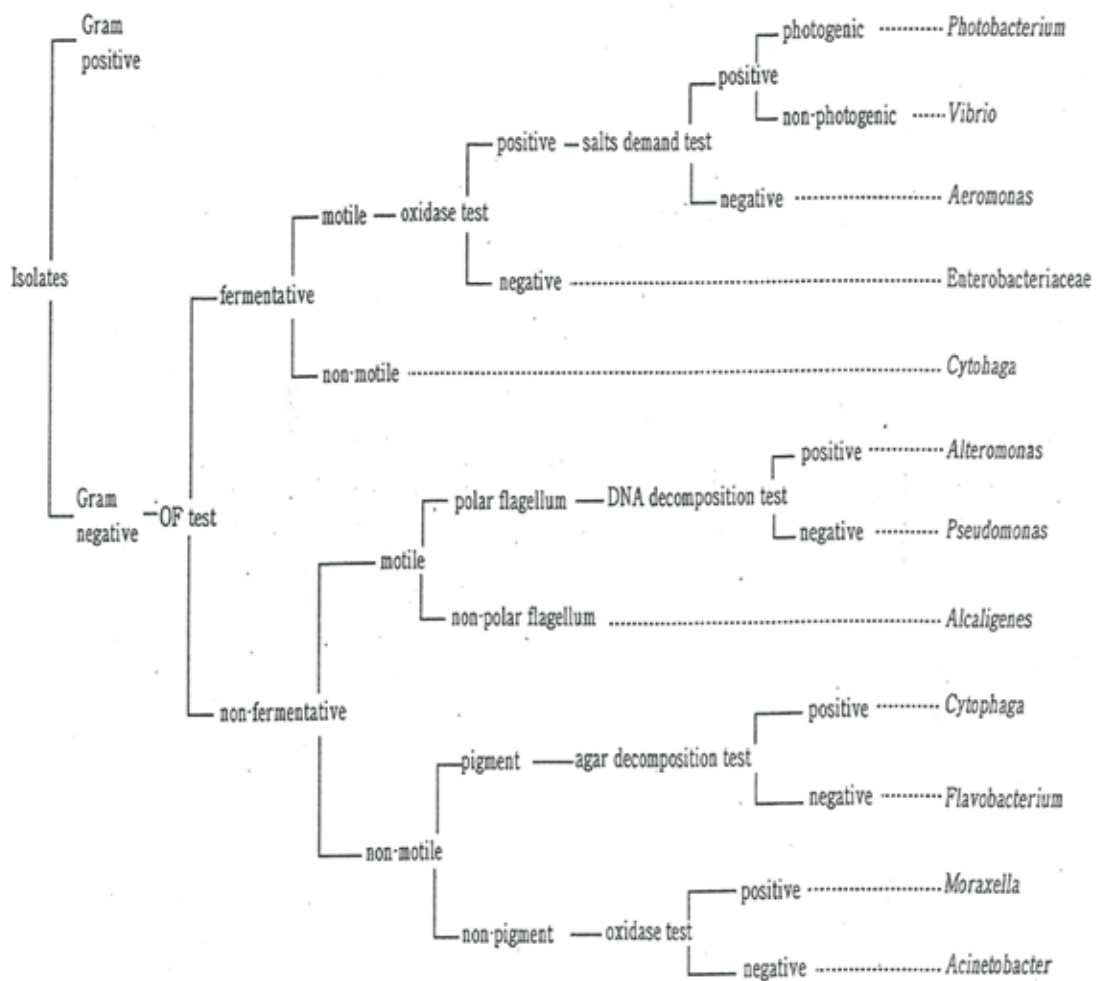


Fig. II-2-2 Scheme used for the identification of bacteria from culture water based on the Ezura and Shimizu methods<sup>82)</sup>.

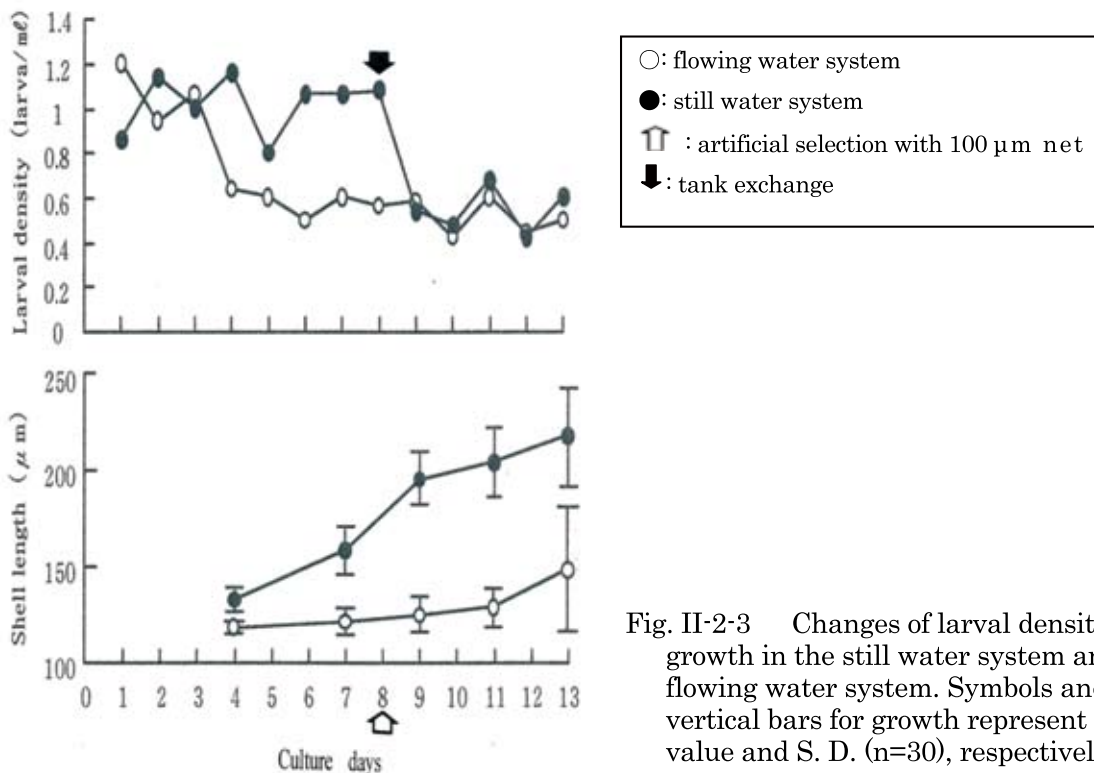


Fig. II-2-3 Changes of larval density and growth in the still water system and the flowing water system. Symbols and vertical bars for growth represent mean value and S. D. (n=30), respectively.

Table II-2-1 Total bacterial counts and genus compositions in sea water obtained from four different sources of initial conditions used in the mass culture of bay scallop *Pecten albicans*. Stored water, seawater just before the culture; hatching water, hatching seawater just before the culture; exchanging water, exchanging seawater on still water system; flowing water, flowing seawater on flowing water system.

genus (%)	Stored water	Hatching water	Exchanging water	Flowing water		
	【Jan.18】	【Jan.18】	【Jan.20】	【Jan.19】	【Jan.20】	【Jan.21】
<i>Vibrio</i>	4	28	12	18	42	50
<i>Pseudomonas</i>	2	42	—	4	18	6
<i>Moraxella</i>	90	6	62	40	18	4
<i>Cytophaga</i>	2	14	6	16	10	4
<i>Flavobacterium</i>	—	—	—	—	—	—
<i>Alcaligenes</i>	—	—	2	—	—	—
<i>Alteromonas</i>	—	—	—	—	—	24
<i>Aeromonas</i>	—	6	—	—	2	—
<i>Enterobacteriaceae</i>	—	—	—	4	—	—
<i>Stapylococcus</i>	—	—	—	—	—	—
Not detected	2	4	18	18	10	12
Total bacterial count (CFU/ml)	$1.2 \times 10^4$	$5.0 \times 10^4$	$8.2 \times 10^4$	$3.5 \times 10^2$	$8.5 \times 10^4$	$2.6 \times 10^4$



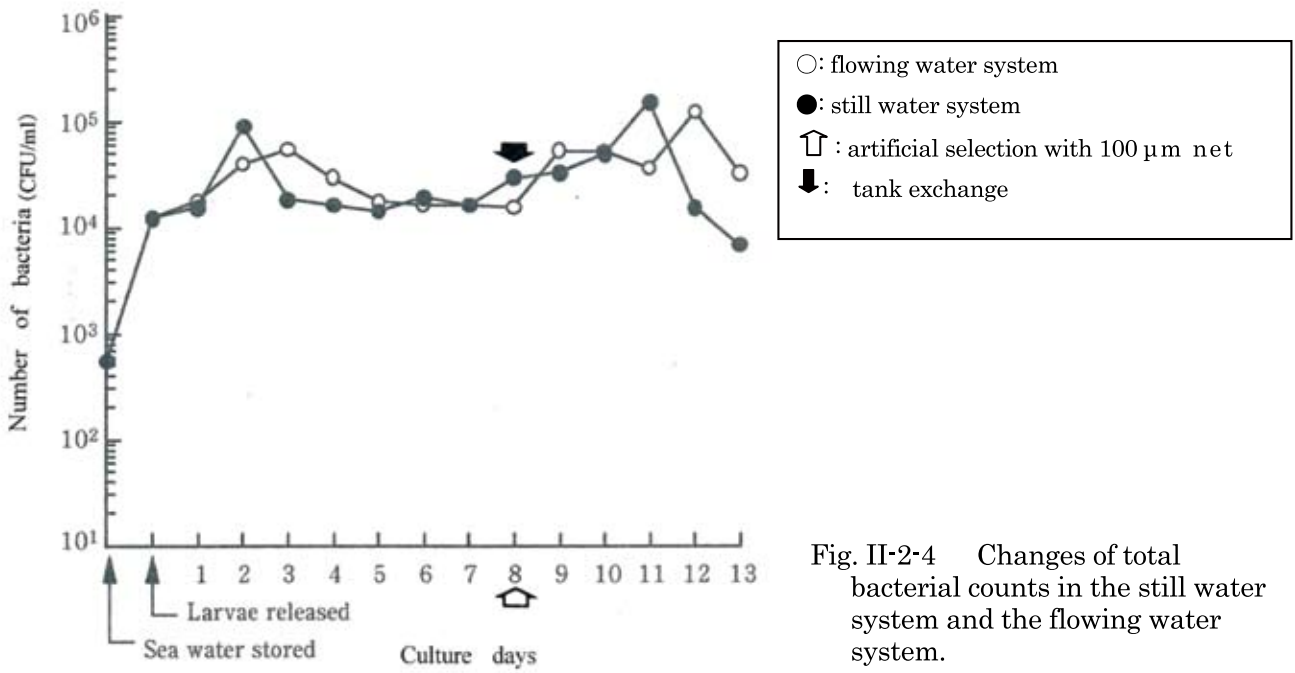


Fig. II-2-4 Changes of total bacterial counts in the still water system and the flowing water system.

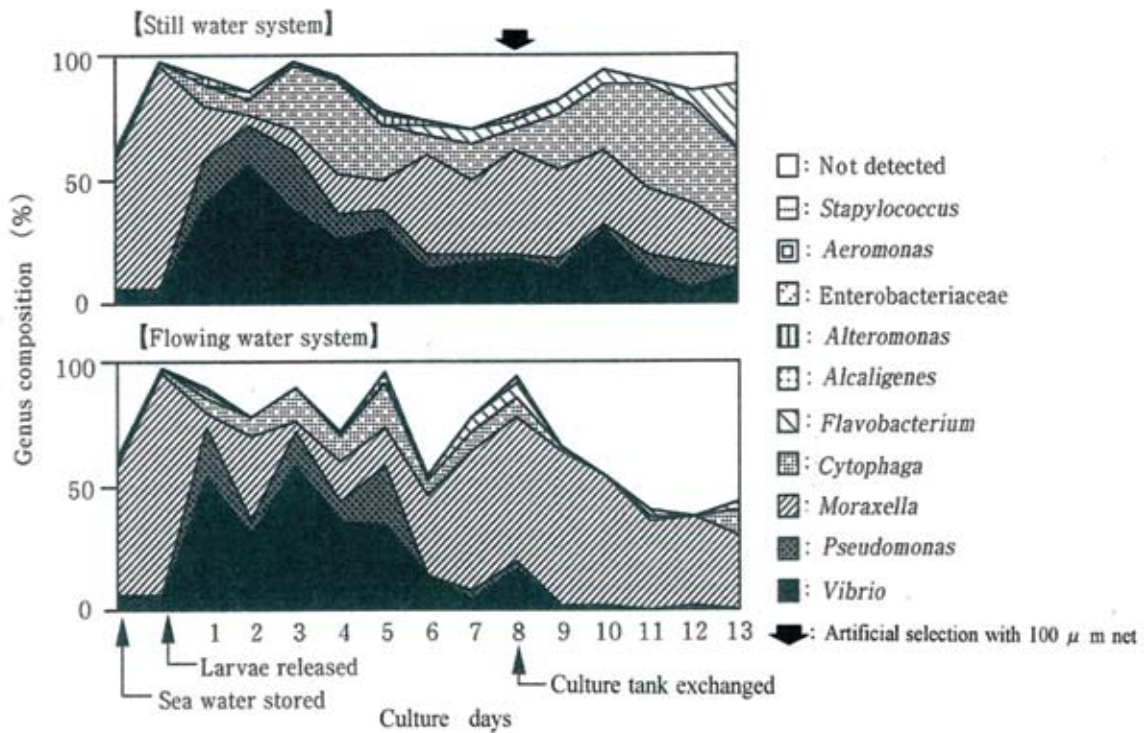


Fig. II-2-5 Changes of genus compositions in the still water system and the flowing water system.

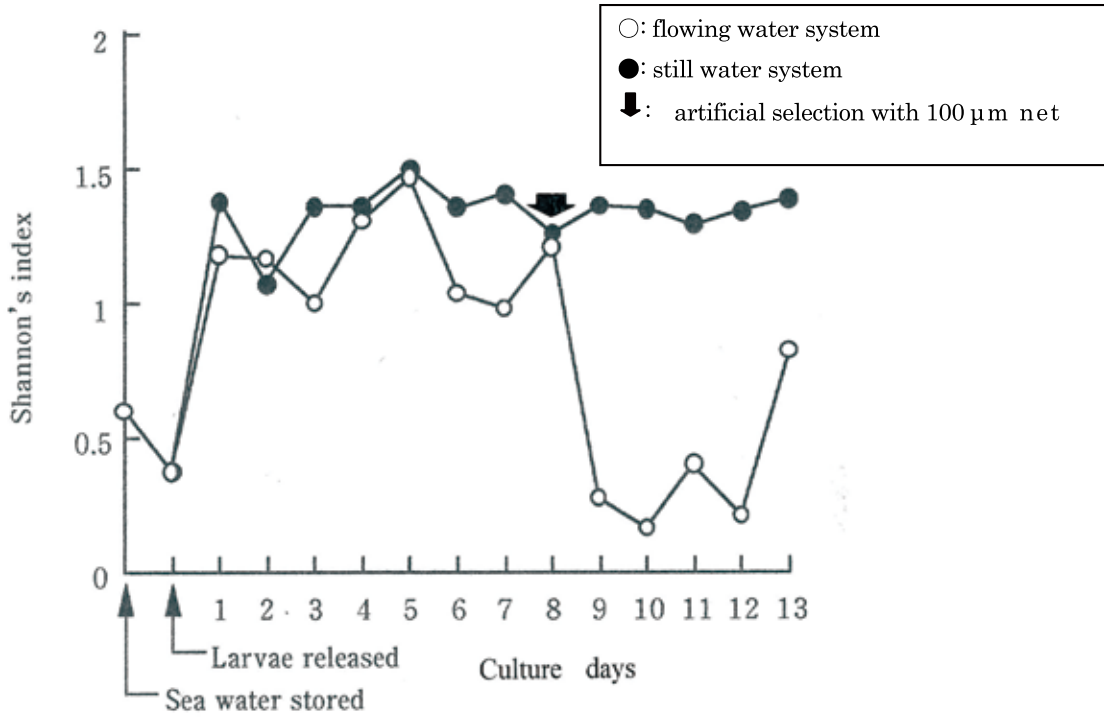


Fig. II-2-6 Changes of Shannon's index calculated from genus compositions in the still water system and the flowing water system.

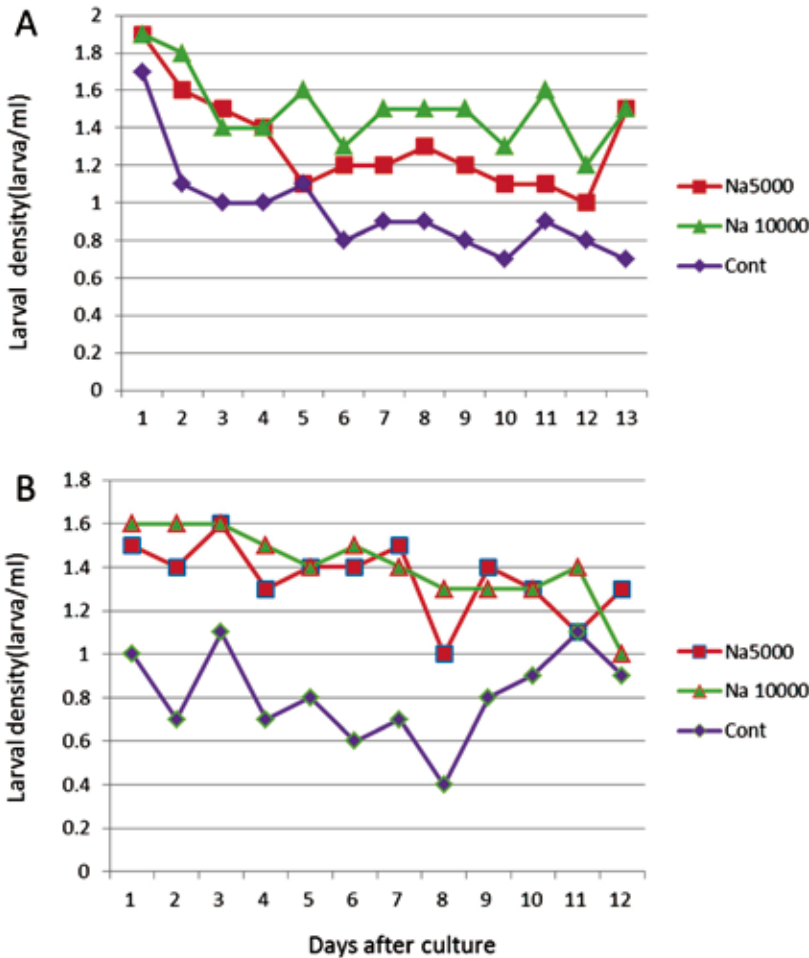


Fig. II-3-1 Changes of larval density of bay scallop *Pecten albicans* in tanks of three different systems using the *Nannochloropsis* sp. culture at 1<sup>st</sup>. (A) and 2<sup>nd</sup>. (B) experiments. Na5000: cultivation with 5000 cells/ml of *Nannochloropsis* sp. culture, Na10000: cultivation with 10000 cells/ml of *Nannochloropsis* sp. culture, Cont: non-treatment cultivation.

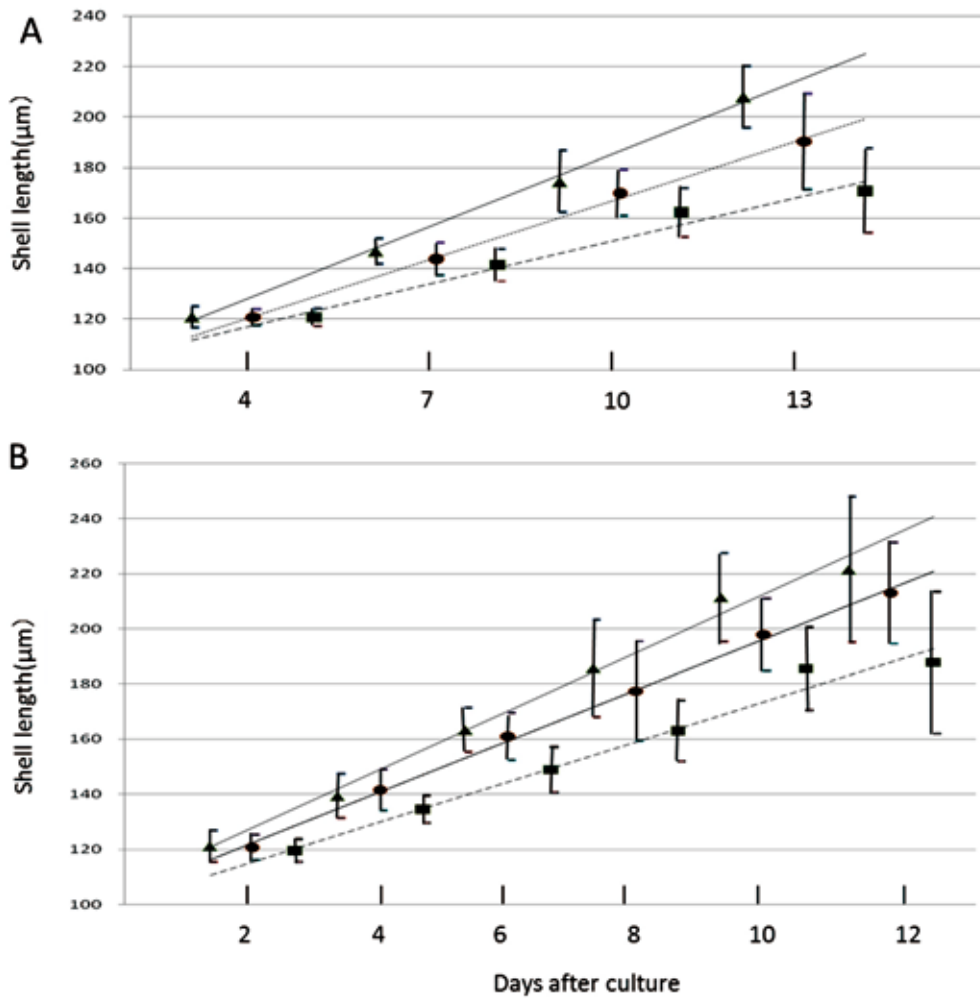


Fig. II-3-2 Changes of larval shell length of bay scallop *Pecten albicans* in tanks of three different systems using the *Nannochloropsis* sp. culture at 1<sup>st</sup>. (A) and 2<sup>nd</sup>. (B) experiments. Vertical bars indicate  $\pm 1$  S. D.. ▲: cultivation with 5000 cells/ml of *Nannochloropsis* sp. culture, ●: cultivation with 10000 cells/ml of *Nannochloropsis* sp. culture, ■: non-treatment cultivation.