

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 31 日現在

機関番号：34419

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25450286

研究課題名(和文) 種苗生産におけるグリーンウォーター技術の高度化と汎用性の強化

研究課題名(英文) Upgrading and generalization of Green Water technique in seedling production of fish larvae

研究代表者

江口 充 (EGUCHI, Mitsuru)

近畿大学・農学部・教授

研究者番号：40176764

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：種苗生産では飼育水に微細藻類を添加し(グリーンウォーター)、仔稚魚減耗の低減化を図る。一方、動物の腸内細菌叢は動物の健康に多大な影響を与えることが明らかになっている。本研究では飼育水環境の様々な細菌叢が仔稚魚の消化管内細菌叢の形成にどの様に関わるのか、ナンノクロロプシス(ナンノ)で確認された善玉菌効果がナンノ以外の微細藻類(珪藻)でも存在するのかを検証した。その結果、仔稚魚の消化管内細菌叢は主に餌飼料の細菌叢の影響を受けるが、グリーンウォーターで善玉菌として威力を発揮したSulfitobacter属の細菌もマダイ消化管内に定着していること、珪藻にも善玉菌群が存在することを確認した。

研究成果の概要(英文)：Green microalgae are widely used for fish seedlings in aquaculture industry as green water. The aim of this study was to evaluate the possible correlations between bacterial community structure of fish larva and the environmental compartments of their habitat. The gut microbiota of fish larvae was mainly influenced the microbiota of feed, however the good bacteria, Sulfitobacter sp., found in green water of Nannochloropsis oculata was also settled down in the gut of larvae of red sea bream. It was also found that diatom green water had its own good bacterial community, which suppressed the growth of bad bacteria.

研究分野：農学 水産学一般

キーワード：消化管内細菌叢 微細藻類 グリーンウォーター 善玉菌 種苗生産 微生物

### 1. 研究開始当初の背景

種苗生産の現場には「水作り」という言葉がある。これは、魚類の種苗生産を安定的に行うことができる飼育水環境の確立を意味する。実際には飼育水環境を整えるために微細藻類を使い、飼育水が緑色になるので、海外ではグリーンウォーター Green Water と呼ぶ。種苗生産用の水槽内には養殖魚の仔稚魚を頂点する食物網が存在し、仔稚魚と微生物からなる独自の生態系が形成されている。この飼育水生態系には種苗生産の過程で様々なインパクトが人為的に加えられる。それに応じて飼育水生態系は大きく4つのステージに分けることができる。1) 受精卵が収容され微細藻類(多くは *Nannochloropsis oculata*、細胞サイズが3 μm程度、以下ナンノ)が加えられた止水状態、2) 海水交換が徐々に始まるがそれほど大きくなく、微細藻類と仔魚の餌のシオミズツボフムシ(以下フムシ)が共存する状態、3) フムシと併用してアルテミアのノープリウス幼生(以下アルテミア幼生)が導入され、仔稚魚とフムシとアルテミア幼生が共存する状態、4) 配合飼料、クロマグロの場合ではインダイのふ化仔魚などが与えられる状態、である。グリーンウォーターの効果として次のことが指摘されている: 飼育水が緑色に濁ることで光環境が変化し孵化仔魚が落ち着く、仔魚の餌生物のフムシが微細藻類を捕食することで栄養価がある、飼育水の水質環境が良くなる。

ナンノ・グリーンウォーターの研究から、ナンノ培養液に存在する善玉菌は *Roseobacter* グループの *Sulfobacter* sp.、*Thalassobius* sp.、*Antarctobacter* sp.、*Rhodobacter* sp.、*Stappia* sp.であり、既報研究で報告されている善玉菌とは異なるものが多いこと(Sharifah and Eguchi, PLoS ONE 6(10): e26756, 2011)、ナンノの増殖が活発化すると飼育水中に存在したほとんどのビブリオ属細菌の生菌数が検出限界以下に減少し、DNA レベルでも検出不能になり、ビブリオ属細菌の群集構造が単純化することが明らかになっている(Taniguchi et al., Aquaculture Science 59: 451-458, 2011)。特に *Sulfobacter* sp.は、通常の滅菌海水中でも *V. anguillarum* の増殖をある程度抑制したが、ナンノ・グリーンウォーターのろ液中では、殺滅効果が飛躍的に向上し、この善玉菌のビブリオ菌への殺滅効果を高める物質は、光合成代謝産物のうちの熱に安定な低分子の物質であることも確認されている(Sharifah and Eguchi, PLoS ONE 6(10): e26756, 2011)。

一方、哺乳類を中心とした研究から、動物の腸内細菌叢が動物の健康状態に多大な影響を与えることが明らかになってきた。魚類も例外ではないことが予想されているが、魚類の消化管内細菌叢に関する研究は未だ発展途上である。種苗生産での飼育水環境の様々な細菌叢(飼育水や餌飼料など)が、仔稚魚の消化管内細菌叢の形成にどのような影

響を与えるのかは興味深く、健全な養殖魚の生産技術の向上という意味で重要である。

### 2. 研究の目的

(1) 飼育水環境と仔稚魚の消化管内細菌叢の形成過程を明らかにする(グリーンウォーター技術の高度化): 仔稚魚の健康に影響を与えることが予想される消化管内細菌叢が、飼育環境の何の影響をどのように受けて形成されていくのかを明らかにする。特に飼育水、餌飼料、仔稚魚の消化管内の細菌叢の違いを明らかにする。

(2) ナンノクロロプシス以外の微細藻類にもナンノ・グリーンウォーターと同様の効果があるのかを明らかにする(グリーンウォーター技術の汎用性の強化): エビ等甲殻類の種苗生産でよく利用される珪藻類に注目し、珪藻類にもナンノと同様のグリーンウォーター効果が存在するの否かを明らかにする。なお、本研究で使用した珪藻 *Cheatoceros neogracile* の場合、厳密に言う培養液の色はグリーンではなくブラウンであるが、本報告では便宜上グリーンウォーターと呼ぶ。

### 3. 研究の方法

(1) 細菌叢の解析: 飼育水、餌飼料、クロマグロ仔稚魚とマダイ仔稚魚(受精卵から35日齢程度まで)の各試料からDNAを抽出し、PCR増幅を行い、ARISA(automated ribosomal intergenic spacer analysis)法により細菌叢の違いを調べた。

DNA抽出はライソザイム-プロテイナーゼK抽出法で行った。採取した仔稚魚、飼育水および餌飼料が入っているジルコプレップミニチューブをVortex-Genie2(G-560, Scientific Industries)を用いて15分間激しく撹拌した。ジルコプレップミニチューブに、ライソザイム(終濃度15 mg/mL)を加え、よく撹拌した。ロータリーミキサー(NRC-20D、容器ホルダーK型1.5 mL/12本用、日伸理化)で撹拌しながら、37で60分間培養した。培養後、プロテイナーゼK(終濃度2 mg/mL)とSDS(終濃度1.8%)を加えた。ロータリーミキサーで撹拌しながら、55で60分間培養した。培養後、細胞懸濁上清に上清等量のフェノール(核酸抽出用、和光純薬)を加え、20630 × g、20で5分間遠心分離した。このフェノール処理を3回行った。上清等量のフェノール-クロロホルムを加え、20630 × g、20で5分間遠心分離した。その後、エタノール沈殿を行った。DNAをTE buffer(pH 8.0)で溶解後、ナノドロップ分光光度計(ND-1000, Thermo Scientific)でDNA濃度を測定した。

PCR増幅は細菌の汎用遺伝子である16S rRNA遺伝子に特異的なプライマーセットを用いて行った。使用したプライマーは、フォワードプライマー 16S-1392F

(5'-G[T/C]A CAC ACC GCC CA-3')とリバースプライマー-23S-6FAM-125R (5'-GGG TT[G/C/T] CCC CAT TC[A/G] G-3')である。リバースプライマーには5'-末端に蛍光色素6FAMが標識されている。PCR反応液20  $\mu$ L系(1  $\times$  buffer[2 mM MgCl<sub>2</sub>], dNTP[0.2 mM each], 1.0  $\mu$ M各プライマー、0.8 mg mL<sup>-1</sup> BSA、TaKaRa Ex Taq 0.025 units)に鋳型DNAを加え、C1000™サーマルサイクラー(185-1048JB、Bio-Rad Laboratories)を用いてPCRを行った。PCRのサイクルを、95 : 3分、(95 : 30秒、56 : 30秒、72 : 45秒)  $\times$  30サイクル、72 : 7分で行った。このPCR増幅産物を2%アガロースゲル電気泳動で確認した。

ARISA解析は16S rRNA遺伝子と23S rRNA遺伝子間のITS領域の塩基数を比較する方法である。ARISAでは未反応のdNTPやプライマーを取り除くため、MinElute PCR Purification Kit (28006、Qiagen)およびPCR増幅産物精製用カラム(FAPCK-50、チヨダサイエンス)を用いて、PCR増幅産物の精製を行った。精製済みのPCR増幅産物のDNA濃度をナノドロップ分光光度計で測定し、各試料を25 ng/ $\mu$ LとなるようにTE bufferで調整した。ARISAに供するDNA量を100 ngとした。マーカーとしてはGS1200-LIZ (4379950、Applied biosystems)を使用した。ARISAにはABI3130xl Genetic Analyzer (ABI3130、Applied biosystems)を用いた。ARISAピークパターンを、フラグメント解析ソフトウェアPeak Studio version 2.X (MacCafferty et al., Environmental Microbiology reports 4: 556-561, 2012)で解析した。700 bpまでのピンサイズを3 bp、700~1000 bpまでを5 bp、1000 bp以上を10 bpとした。ピークをOTU (operational taxonomic unit; 操作的分類単位)およびピークの高さを現存量として扱い、細菌叢の多様度および細菌叢間の非類似度を算出した。細菌叢の多様度としてはOTU数、Simpson多様度指数(1/D)、Shannon-Wiener多様度指数(H')および均衡度(E)を算出した。細菌叢間の非類似度としてはChao指数(Chao et al., Ecology Letters 8: 148-159, 2005)で算出した。算出した類似度を用い、群平均法によるクラスター解析と非計量的多次元尺度法(nMDS)による解析を行った。これらはすべて統計解析ソフト「R」のVeganおよびMASSパッケージで行った。

(2)珪藻 *Cheatocecos neogratile* 培養液のグリーンウォーター効果について調べた。使用した珪藻は甲殻類などの初期試料として販売されている珪藻 *Ch. neogratile* である。珪藻の培養には微細藻類培養用のKW21培地を使用した。メンブレンフィルター(IWAKI)を用いて、ろ過滅菌を行った海水1LにKW21培地の溶液(第一製網)を1.0 mL/L、メタケイ酸ナトリウム(和光

純薬) 90 mg/Lを加えた後、よく攪拌した。調製したKW21培地に珪藻を接種し、振とう培養した(培養条件:室温、14 h light  $\cdot$  10 h darkの明暗サイクル、110 rpm)。珪藻の計数はピュルケルツルク氏二重血球算定盤(日本臨床器械工業)を用いて、落射型蛍光顕微鏡(BX51、オリンパス)で行った。悪玉菌の指標菌として魚病細菌である *Vibrio alginolyticus* NBRC 15630株を用いた。悪玉菌に対する珪藻グリーンウォーター効果の確認は次の要領で行った。まず、滅菌済みのKW21珪藻用培地を100 mLずつ加えた三角フラスコに *Ch. neogratile* を接種し、4日間振とう培養した。後期対数増殖期から初期定常期まで増殖した *Ch. neogratile* をフラスコ内の細胞数が  $1.0 \times 10^3$  cells/mLとなるように新たに培地を加えて調整した(3本立て)。珪藻の前培養と並行して *V. alginolyticus* の前培養も1/2ZoBell培地を用いて行い、後期対数増殖期の細菌細胞を滅菌済み3%NaCl希釈水を用いて集菌・洗浄(2回)した。洗浄済みの *V. alginolyticus* 細胞を接種後の細胞濃度が  $1.0 \times 10^5$  CFU/mLとなるように珪藻 *Ch. neogratile* の前培養液に接種した。その後、5日間振とう培養(培養条件:室温、14 h light  $\cdot$  10 h darkの明暗サイクル、110 rpm)を行い、培養液の一部を毎日採取した。一般細菌数と病原菌のコロニー数を求めるため、培養液を1/2ZoBell寒天培地とTCBS培地に100  $\mu$ Lずつ塗抹し、1/2ZoBell寒天培地は3日間、TCBS培地は24時間、室温・暗所で培養した。その後、形成されたコロニー数を計数した。一連の3本立ての実験を2回繰り返し、再現性を確認した。

珪藻グリーンウォーターに共存する善玉菌の効果の確認は次のように行った。4日間振とう培養(室温、明暗サイクル14 h-L/10 h-D、110 rpm)した *Ch. neogratile* の細胞数を計数した後に、遠心分離(8000  $\times$  g、15分間)を行い、その上澄液を孔径0.2  $\mu$ mのシリンジフィルター(IWAKI)を用いてろ過し、珪藻グリーンウォーター中の細菌細胞を除去した。このろ過滅菌を行った培養液(以下、グリーンウォーターろ液)を容量15 mLの遠沈管に10 mLずつ入れ、そのろ液が入った遠沈管に、後期対数増殖期まで増殖している悪玉菌 *V. alginolyticus* を上述と同じ方法で集菌・洗浄し、グリーンウォーターろ液に細菌数が  $1.0 \times 10^5$  CFU/mLとなるように接種した。その後、5日間振とう培養(室温、20、明暗サイクル14 h-L/10 h-D、110 rpm)を行い、グリーンウォーターろ液の一部を毎日採取した。グリーンウォーターろ液中の悪玉菌のコロニー数を求めるため、培養液をTCBS培地に100  $\mu$ L塗抹し、24時間、室温・暗所で培養し、形成されたコロニー数を計数した。一連の実験を3回繰り返し、再現

性を確認した。

#### 4. 研究成果

(1) クロマグロの種苗生産初期 (Day 1 から Day 3) および種苗生産中期 (Day 3 から Day 17) における消化管内細菌叢は、それぞれ飼育水および餌飼料の細菌叢に類似する傾向があった (図 1)。このことは、消化管内細菌叢は種苗生産初期から中期には飼育水や餌飼料などの周囲環境由来の細菌叢の影響を強く受けることを示しており、この時期における周囲環境の細菌叢の重要性を示唆する。種苗生産初期および中期における細菌性の病気による大量死を防ぐためには、この時期の周囲環境の細菌叢制御が鍵を握るだろう。しかし、種苗生産後期になると消化管内細菌叢は飼育水および餌飼料の細菌叢とは異なる独自の細菌叢を形成する傾向があった (図 1)。

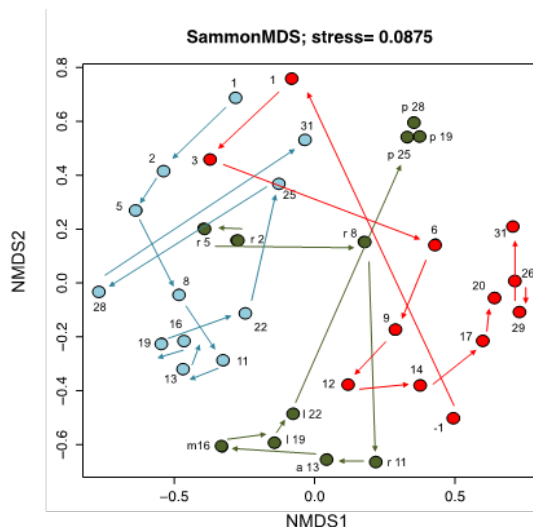


図 1. クロマグロ仔稚魚の消化管 ( )、飼育水 ( ) および餌飼料 ( ) における細菌叢の ARISA ピークパターンの nMDS 解析。餌飼料の r はワムシ、a はアルテミア、l はイシダイ仔魚、m はワムシとアルテミアおよびイシダイ仔魚の混合飼料、p はペレットを表す。プロットそばの数値は孵化日を 0 日とした日数。

また、クロマグロ仔稚魚の消化管内細菌は、種苗生産初期よりも後期で細菌種数が減少する傾向にあった。その種数は種苗生産初期には 30 種を超えることもあったが、後期には 5~9 種となった。一方、飼育水や餌飼料では、細菌が 30 種以上検出されることが多かった。同じワムシの餌飼料であっても検出される細菌種数は 10~68 種とばらつきがあった。消化管内細菌叢の Simpson 多様度指数 (1/D)、Shannon-Wiener 多様度指数 (H') および均衡度 (E) は、飼育水や餌飼料細菌叢のそれらと比較して有意に低かった ( $p < 0.05$ )。たとえば、Simpson 多様

度指数に関して、消化管内細菌叢では 3.17~13.1 (中央値 6.49) であったが、飼育水と餌飼料ではそれぞれ 3.70~15.3 (中央値 9.17) と 2.34~16.7 (中央値 8.46) であった。種苗生産後期の消化管内細菌叢は飼育水および餌飼料の細菌叢とは異なる独自の細菌叢を形成した。

(2) マダイの種苗生産では飼育水よりも餌飼料の細菌叢が消化管内細菌叢により強く影響する傾向を確認した。ただ、生産後期にはナンノのグリーンウォーターに由来すると考えられる善玉菌 *Sulfitobacter* 属細菌が消化管内細菌叢から検出された。これはグリーンウォーター効果かもしれない。

(3) 珪藻 *Ch. neogracile* は、魚病細菌の増殖を抑制した (図 2)。珪藻と悪玉菌を共存させて培養すると培養開始から 5 日目には対照区が  $10^6$  CFU/mL を維持したのに対して、共存区では悪玉菌の生菌数が  $10^2$  CFU/mL と 4 桁も低下していた。

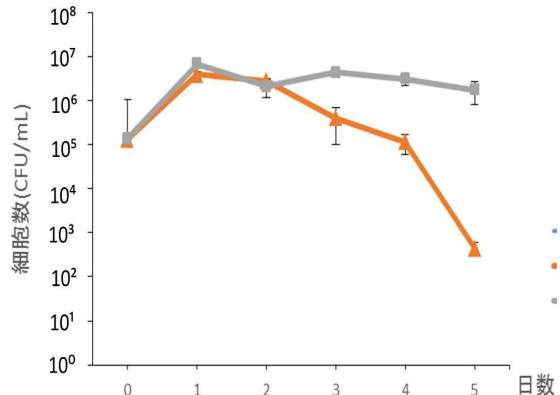


図 2. 珪藻グリーンウォーターに悪玉菌 *V. alginolyticus* を接種したときの悪玉菌の生菌数の経時変化。オレンジの折れ線が珪藻と悪玉菌が共存した場合であり、グレーの折れ線は滅菌済みの珪藻用培地に悪玉菌のみを接種した場合 (対照区)。

さらに、珪藻 *Ch. neogracile* の培養液に元々存在した細菌を完全に除去した珪藻の培養液 (グリーンウォーターろ液) に悪玉菌を共存させた場合では、魚病細菌の増殖抑制効果が確認されなかった (図 3)。

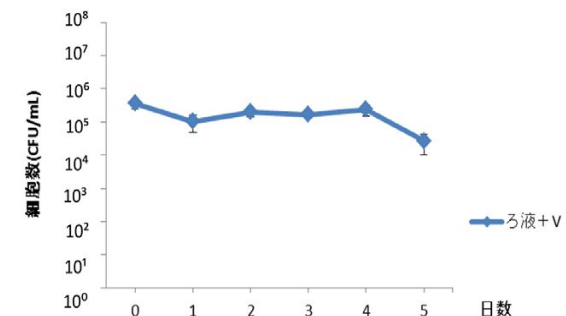


図 3. ろ過除菌した珪藻培養液中での悪玉菌 *V. alginolyticus* の生菌数の経時変化。

珪藻 *Ch. neogracile* ならびに、珪藻 *Ch. neogracile* の培養液中に元々存在する細菌を悪玉菌 *V. alginolyticus* と共存させた場合には悪玉菌が減少し(図2)、珪藻のグリーンウォーター中に元々存在していた細菌細胞を取り除くと悪玉菌の生菌数が大きく減少することはなかった(図3)。少なくとも珪藻 *Ch. neogracile* そのものが細胞外に放出する光合成代謝産物には悪玉菌の増殖を抑制する効果はなく、珪藻 *Ch. neogracile* と親和性の高い共存細菌が存在するときに悪玉菌の増殖を抑制することを確認した。この結果は、珪藻が悪玉菌の増殖を抑制するというグリーンウォーター効果にはナンノと同じく培養液中に元々存在する微細藻類との親和性が高い海洋細菌との協働が必要であることを示す。珪藻のような他の微細藻類と併用すれば、動物プランクトンの栄養強化だけでなく、飼育水の保全にも役立ち、場合によってはナンノの代用品として活用することもできるかもしれない。なお、珪藻類はエビやカニなど甲殻類の養殖用飼育水でも有効活用が期待できる。

本研究の結果から、珪藻のグリーンウォーターにもナンノと同じような悪玉菌の増殖抑制効果があることを確認した。また、養殖魚の健康を制御する可能性がある消化管内細菌叢の仔稚魚期における形成過程についてもある程度明らかになった。ただ、微細藻類の種類が未だ2種類であり、用いた魚病細菌の種類も少なく、十分に研究し尽くされたとは言えない。今後更に研究を継続し、グリーンウォーター技術を向上させ、薬剤などを一切使用しない健全な種苗生産法の確立に努める必要がある。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 1 件) 査読アリ

Akito Taniguchi, Ryuichiro Aoki and Mitsuru Eguchi. Microbial communities in various waters used for fish larval rearing. *Aquaculture Research* 47: 370-378 (2016). DOI: 10.1111/are.12495

〔学会発表〕(計 4 件)

西田雄人、井上 勇、谷口亮人、江口 充。養殖マダいの仔稚魚期における消化管内細菌叢の解析。平成 28 年度日本水産学会春季大会、2016 年 3 月 28 日、東京海洋大学、東京都港区。

西田雄人、井上 勇、谷口亮人、江口 充。養殖マダいの種苗生産期における消化管内細菌叢の解析。平成 27 年度日本水産学会近畿支部後期支部例会、2015 年 12 月 13

日、京都大学、京都府京都市。

西田雄人、青木隆一郎、滝野雄斗、小原紘平、梶 暁登、井上 勇、谷口亮人、江口 充。養殖マダイおよびトラフグの仔稚魚期における腸内細菌叢の解析。平成 27 年度日本水産学会春季大会。2015 年 3 月 28 日、東京海洋大学、東京都港区。

青木隆一郎、谷口亮人、江口 充。完全養殖クロマグロの成長過程における消化管内細菌叢の変遷。平成 25 年度日本水産学会秋季大会、2013 年 9 月 20 日、三重大学、三重県津市。

〔図書〕(計 1 件)

江口 充 (分担執筆)。72 種苗生産と微生物、環境と微生物の事典(A5/448 ページ)、日本微生物生態学会編、朝倉書店、東京、2014 年、pp. 145-146。

〔その他〕

ホームページ等

近畿大学農学部水産学科 水族環境学研究室 <http://kindai-suizoku.daa.jp/>; 近畿大学農学部 <http://nara-kindai.univ.jp/>

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

江口 充 (EGUCHI, Mitsuru)

近畿大学農学部・教授

研究者番号：40176764