

平成 21 年 4 月 23 日現在

研究種目：基盤研究 (C)
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19580222
 研究課題名 (和文) 微生物ループと微細藻類による細菌群の制御を活用した魚類の種苗生産
 研究課題名 (英文) Effective larval production based on the regulation of bacterial assemblage by microbial-loop and microalgae in rearing waters
 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

研究成果の概要：「水作り」という言葉がある。養殖魚類の受精卵を収容する飼育水の水質環境を微細藻類により整えることを指す。本研究では微細藻類による飼育水細菌群の制御機構の解明を目的とし、微細藻類の培養液に多く存在する善玉細菌（例：*Roseobacter* 属細菌）の働きと微生物ループの生態学的機能に注目した。善玉細菌は常にビブリオ属魚病細菌の増殖を抑制したが、微細藻類が共存するとその抑制効果が飛躍的に向上した。また、飼育水温の高いクロマグロ仔魚はマダイ仔魚などと異なり、微生物ループを経由した栄養を積極的に利用していた。これは経験的に行われてきた「水作り」を、科学的に検証した初めてのケースといえる。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2008 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：水族環境学・水圏微生物生態学

科研費の分科・細目：水産学・水産学一般

キーワード：種苗生産、微生物ループ、水作り、微細藻類、*Roseobacter* 属細菌、細菌群集構造、バイオコントロール、増養殖

1. 研究開始当初の背景

魚類の種苗生産における「水づくり」では、飼育水へ微細藻類がしばしば添加される。特に細胞サイズが $3 \mu\text{m}$ 程度の *Nannochloropsis oculata* (以下、ナノクロ) が培養条件の単純さ故に用いられることが多い。微細藻類の添加については、1) 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、2) 仔魚の餌生物のワムシが微細藻類を捕食することで栄養価を上げ

る、3) 飼育水の水質環境が良くなる、といったことが指摘されている。1) や 2) についてはある程度効果が科学的に検証されている。3) については飼育水のアンモニアをナノクロが取り込み低減するといわれているが、この点については賛否が分かれている。さらに、微細藻類の添加効果について述べた論文では、「飼育水中の微細藻類と細菌群との関係」が常に考察で触れられているが、明確なデータが示されていないのが現状であ

る。

2. 研究の目的

(1) 微生物ループの存在と活用

本研究の目的のひとつは、種苗生産用飼育水中の微生物ループが仔魚の生育・生残にどのような影響を与えるのかを明らかにし、その活用法を探ることである。この点については報告者のグループの今までの研究により次のような可能性を確認している：1) 魚類の種苗生産用の飼育水中には微生物ループが形成される、2) 水温の比較的低いマダイ仔魚（水温 20℃）は摂餌に微生物ループを利用しない、3) クロマグロ仔魚（水温 27℃）は従属栄養性微小べん毛虫類（HMF）を選択的に捕食しており微生物ループを積極的に利用している。

クロマグロ仔魚は微生物ループを積極的に利用し、マダイはあまり利用していない。これはクロマグロとマダイの食性の違いも考えられるが、飼育水温の違いによる可能性もある。飼育水生態系の微生物ループ（ナノクロ→DOM→細菌→HMF→仔魚）は、人為的に形成した食物連鎖（ナノクロ→ワムシ→仔魚）とは異なり、自然に形成されたものである。水温が高いとナノクロの光合成活性や細菌群の増殖活性が上昇する。それに伴い HMF の捕食活性が上昇し、飼育水生態系における重要度が相対的に上がるのかもしれない。本研究では微生物ループの仔魚の成長・生残への寄与率をマダイ・クロマグロ・マーブルゴビー（東南アジアでの重要養殖魚種、中華料理の高級食材）などの養殖魚の飼育水において明らかにする。

(2) 微細藻類による細菌群の制御

ナノクロによる細菌群集の制御機構を明らかにする。飼育水環境の物理・化学的環境条件の違いにより、当然、ナノクロの生理状態（光合成活性や増殖活性など）は変化する。ナノクロの生理状態が変化すると飼育水中の細菌群集が連動して変化する。ナノクロ培養における光・水温・栄養塩といった環境条件が、ナノクロの生理状態にどのように影響し、その生理状態の変化が細菌群集構造にどのように影響するのかを明らかにする。ナノクロ培養を制御することで、ワムシ投与時に大量に持ち込まれる γ-プロテオバクテリアの増殖を抑制し、魚類種苗の安定的な生産に貢献する細菌群集構造の維持を可能にする。

3. 研究の方法

(1) 微生物ループに関する捕食実験

魚種により飼育水内の微生物ループによるエネルギー流を利用する仔魚と利用しない仔魚があるのか否かを明らかにする。実験方法は捕食者と被捕食者を共存させた状態で一定時間培養後、各微生物を各種顕微鏡により計数・定量する。各微生物群（ワムシ、ナノクロ、原生動物、微小鞭毛虫類、細菌、ラン藻類など）はサイズ分画し、各種染色法で染め分けて計数・定量化する。

(2) RI 標識したナノクロ細胞によるトレーサー実験

クロマグロやマーブルゴビーで予測された「ナノクロ→溶存態有機物（DOM）→従属栄養性微小鞭毛虫類（HMF）→仔魚」の微生物ループに基づくエネルギー流を明らかにする。まず、ナノクロの無菌培養系確立し、無菌培養のナノクロをさらに ^{14}C で標識した重炭酸ナトリウムを添加した無機栄養塩培地で 12 時間明/12 時間暗で培養する。このナノクロの無菌培養液を孔径 $3\mu\text{m}\rightarrow 0.2\mu\text{m}\rightarrow 0.1\mu\text{m}$ のフィルターで順次無菌的に濾過し、ナノクロ細胞から溶出した ^{14}C -光合成代謝産物を得る。この ^{14}C -光合成代謝産物の飼育水中の細菌群による取り込み活性・呼吸による無機化活性を測定する。

(3) 善玉菌と悪玉菌（魚病細菌）の共存培養実験

善玉菌の代表として魚類の飼育水槽や微細藻類の培養液から分離した *Roseobacter* 属細菌株と魚病細菌の代表格として *Vibrio anguillarum* 株を用いる。3 種類の培地（滅菌した天然濾過海水、従属栄養性海洋細菌用の有機栄養分が豊富な VNSS 培地、無菌培養したナノクロなどの微細藻類の培養ろ液）中で、2 種類の細菌株が共存したときのそれぞれの増殖の様子を、寒天平板法による生菌数の経時変化から調べる。

4. 研究成果

(1) 捕食実験

クロマグロの仔魚では選択的に微生物ループに存在する微小べん毛虫類を捕食していた。これはクロマグロ仔魚にとって、微生物ループを経由したとエネルギー流が重要であること、微生物ループを通して供給される栄養物が必要になる可能性を示す。クロマグロに対して、マダイ仔魚の飼育水では、微生物ループからマダイへ繋がる経路は全く見出せなかった。これは、飼育水温の影響が

大きいようであり、飼育水温が 27°C 前後のクロマグロ飼育水では微生物ループが活性化し、水温が 20°C 前後のマダイでは、捕食実験で検出されるほど微生物ループそのものが活発化しなかったようである。飼育水中にも微生物ループが存在し、それが養殖魚の仔魚に利用されているという事実は極めて新規な発見といえる(図 1、発表論文③)。ただし、クロマグロの場合でも、人為的に餌生物として添加された、微細藻類→ワムシ→クロマグロ仔魚、といったエネルギー流が圧倒的に卓越することは間違いない。

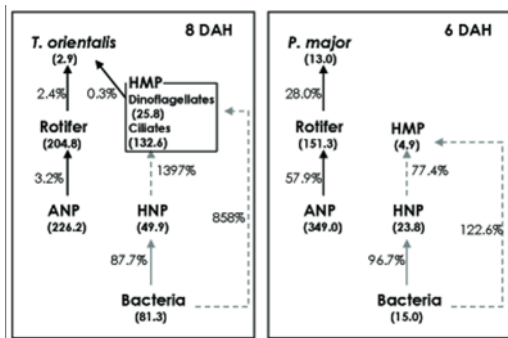


図 1. クロマグロ (*Tuna orientalis*) とマダイ (*Pagrus major*) 仔魚の飼育水中におけるエネルギー流 (発表論文③を一部改変)

今回、新たに浮上してきた問題点として、飼育水中における原生動物群の存在がある(発表論文①)。飼育水温がクロマグロよりも高いマダイの場合、飼育水中の原生動物群集がさらに活発化し、微細藻類の大半を捕食してしまうことが判明した。そのため、ワムシがその餌生物である微細藻類の不足により栄養失調になり、そのワムシを摂餌した養殖魚の仔魚の健康状態が悪化したのである。この問題については、今後、原生動物の増殖を抑制する微細藻類などの微生物群の検索など、様々な側面から対策を考える必要がある。

(2) 善玉菌と悪玉菌

善玉菌である *Roseobacter* 属細菌と悪玉菌である魚病細菌 *V. anguillarum* を、有機栄養分が豊富な VNSS 培地で共存させて培養すると、いずれも白濁するまで大量に増殖した(約 10^9 cfu/ml)。VNSS 培地では有機栄養分が極めて豊富なため、有機栄養分に関して両者は競合することはなく共存可能であり、いずれの細菌も同じように増殖できたようである。

天然海水のような有機栄養分が制限された環境では、*Roseobacter* 属細菌と魚病細菌

V. anguillarum は一旦、同程度まで増殖した(約 10^6 cfu/ml) 後、*Roseobacter* 属細菌はそのままの細胞数を維持したが、*V. anguillarum* は徐々に生菌数が減少していった。このように貧栄養な環境では、*Roseobacter* 属細菌が *V. anguillarum* を駆逐するようなメカニズムが働き始めるのかも知れない。もっとも、魚病細菌の生菌数は徐々に減少したが、完全に消滅することはなかった。

一方、ナノクロの培養濾液に *Roseobacter* 属細菌と魚病細菌 *V. anguillarum* を共存させた場合、上述した 2 つの培地とかなり異なる様相を呈した。両者とも一旦 10^7 cfu/ml まで増加した後、*Roseobacter* 属細菌は高い生菌数を維持したのに対して、*V. anguillarum* の生菌数は急激に減少し、寒天平板を用いた検出方法では全く検出できなくなった。ナノクロの光合成代謝産物が引き金となり、*Roseobacter* 属細菌のビブリオ属魚病細菌に対する殺滅効果を強化したようである(図 2)。

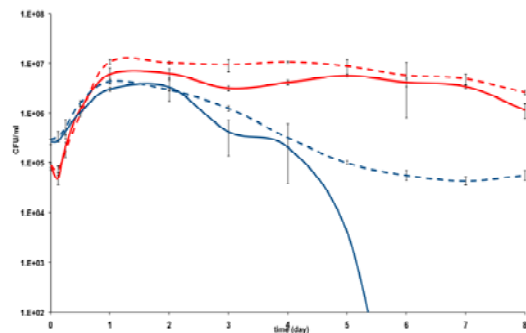


図 2. ナノクロ培養濾液中での 2 種類の細菌株の生菌数の経時変化。実線が *Roseobacter* 属細菌と *Vibrio anguillarum* を一緒に培養した場合であり、破線はコントロールとして、それぞれを別々に単独で培養した場合を示す。赤色が *Roseobacter* 属細菌の生菌数を、青色が *Vibrio anguillarum* の生菌数を示す。

なお、同様の効果はクロレラについても確認できた。

(3) ^{14}C -光合成代謝産物の利用性の違い

善玉菌と悪玉菌の微細藻類の培養濾液中での挙動の違いは、 ^{14}C で標識した重炭酸ナトリウムを用いた実験においても検証ができた。少なくとも *Roseobacter* 属細菌は、ナノクロから溶出した ^{14}C -光合成代謝産物を極めて効率よく取り込んでいたのに対して、*V. anguillarum* の取り込み活性は桁違いに低くなった。もっとも、この傾向は対数増殖期の

ナノクロ培養濾液において顕著であり、定常期に入って増殖が停止したナノクロ細胞の培養濾液では、*Roseobacter* 属細菌の取り込み活性も *V. anguillarum* の取り込み活性も大きな差が見られなかった。すなわち良い細菌群集構造を保証する「水作り」のためには、飼育水中の微細藻類が高い増殖活性を保持していることがカギのひとつになるようである。

これらの事実は、従来から経験的に行われてきた種苗生産における、良い「水作り」のメカニズムの一つの可能性を示す。溶存酸素や水温、栄養塩類などが同じ水質状態であっても、微細藻類が飼育水中の細菌群集を、仔魚の生残にプラスに働く細菌群が優占するように制御した場合「水作り」は成功し、それが上手くいかない場合は「水作り」に失敗するのかもしれない。これは「水作り」のメカニズムの可能性を科学的に検証した初めてのケースといえる。

飼育水を人間の腸管内に例えるならば、微細藻類は善玉菌の増殖をサポートするサプリメント、すなわち健康補助食品的な機能を果たしているのかもしれない。微細藻類により間接的に飼育水槽内の細菌群集を制御しようとする方法は、いわば飼育水生態系の地道な体質改善を志向する方法といえる。消費者の食の安全への関心の高まりや法改正に伴う薬剤の使用の制限などから、より環境に配慮した飼育法が望まれており、微細藻類による飼育水環境の制御は有用な方法といえる。

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5件)

- ① Yoshizumi NAKAGAWA, Mitsuru EGUCHI, FuiFui CHING, Shigeharu SENOO and Shigeru MIYASHITA. Grazing of protozooplankton assemblages on microalgae in the rearing water of the marble goby, *Oxyeleotris marmoratus*, during early larval rearing. *Aquaculture* **57**: 71-75 (2009). 査読有り
- ② Erina FUJIWARA-NAGATA and Mitsuru EGUCHI. Development and evaluation of a loop-mediated isothermal amplification assay for rapid and simple detection of the pathogen *Flavobacterium psychrophilum*. *Journal of Fish Diseases* **32** (in press) (2009). 査読有り
- ③ Yoshizumi NAKAGAWA, Mitsuru EGUCHI,

and Shigeru MIYASHITA. Pacific bluefin tuna, *Thunnus orientalis*, larvae utilizing energy and nutrients of microbial loop. *Aquaculture* **264**: 83-93 (2007). 査読有り

- ④ Gentoku NAKASE, Yoshizumi NAKAGAWA, Shigeru MIYASHITA, Toshiro NASY, Shigeharu SENOO, Hiroko MATSUBARA and Mitsuru EGUCHI. Association between bacterial community structures and mortality of fish larvae in intensive rearing systems. *Fisheries Science* **73**: 784-791 (2007). 査読有り
- ⑤ Gentoku NAKASE and Mitsuru EGUCHI. Analysis of bacterial communities in *Nannochloropsis* sp. cultures used for larval fish production. *Fisheries Science* **73**: 541-547 (2007). 査読有り

[学会発表] (計6件)

- ① Mitsuru EGUCHI. Ecological function of phytoplankton in larval rearing waters. 5th World Fisheries Congress. 2008年10月22日. 神奈川県横浜市.
- ② Sharifah Noor Emilia. Investigation of the existence of *Roseobacter* sp. in *Nannochloropsis oculata* cultures. 5th World Fisheries Congress. 2008年10月24日. 神奈川県横浜市.
- ③ Mitsuru EGUCHI. Pacific bluefin tuna larvae utilize energy and nutrients of microbial loop. 12th International Symposium on Microbial Ecology (ISME12). 2008年8月19日. オーストラリア・ケアンズ.
- ④ 中瀬玄徳. ナノクロロプシスの培養ろ液による γ -proteobacteria の増殖抑制. 2007 (平成19) 年度日本水産学会秋季大会. 2007年9月26日. 北海道函館市.
- ⑤ 中瀬玄徳. Growth suppression of gamma-proteobacteria by *Nannochloropsis* culture filtrate. 第23回日本微生物生態学会 (ISME Asia 2007 同時開催). 2007年9月16日. 愛媛県松山市.
- ⑥ 中川至純. Linking microbial loop to higher trophic levels. 第23回日本微生物生態学会 (ISME Asia 2007 同時開催). 2007年9月16日. 愛媛県松山市.

[図書] (計1件)

江口 充. 恒星社厚生閣、「養殖の餌と水—陰の主役たち (杉田治男編)」, 平成20 (2008) 年, pp.115-127, 140-151, 160-165.

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

(2) 研究分担者

宮下 盛 (MIYASHITA SHIGERU)

近畿大学・農学部・教授

研究者番号：80088658

中川至純 (NAKAGAWA YOSHIKAZUMI)

近畿大学・水産研究所・助教

研究者番号：70399111

中瀬玄徳 (NAKASE GENTOKU)

近畿大学・水産研究所・博士研究員

研究者番号：40454623

(但し、H19 年度のみ。就職により所属機関を異動したため、本人承諾の上、H20 年度は研究分担者から退いた)