

魚類種苗の生産における飼育水の細菌群集構造の変動

江口 充^{1*}, 中瀬玄德^{1,2}

(環境保全・資源動態グループ)

¹近畿大学大学院 農学研究科, ²日本学術振興会特別研究員

*eguchi@nara.kindai.ac.jp

医療技術の進歩と共に世界の人口が劇的に増大した。増大した人口を維持していくためには大量の食料が必要である。その大量の食料を天然資源だけで賄うことは難しく、人類は食料を作り出していかなければならない。日本は、国内に広大な農作地を確保できず、また周囲を海に囲まれている。食料確保の点において、日本における水産資源の重要性は非常に高い。この水産資源を作り出す過程が魚類養殖である。この魚類養殖は、持続的かつ安定的に行われねばならない。

養殖を安定的に続けていくためには、大量の種苗を安定して供給できなければならない。大量に種苗を確保するためには、集約的に種苗を生産する必要がある。ところが、集約的に種苗生産を行うと、しばしば種苗の大量へい死が発生する。この大量へい死の発生が、種苗の安定生産を妨げている。以前より種苗生産における大量へい死の問題は研究されており、大量へい死には飼育水中の微生物群集が関係していることが指摘されてきた。しかし、その原因を明らかにするには至っていない。これは種苗生産を定量的・定性的に調査することが少なく、また実験を小規模の飼育で行うことが多いため、実験結果が商業規模の生産には反映されにくいことに起因する。さらに、飼育水中の細菌群集に関する研究のほとんどが培養法で行われており、飼育水中の全ての細菌群を検討できていないのが現状である。

微生物生態学的な観点から大量へい死の原因を探るためには、種苗生産時の飼育水において微生物群集がどのような挙動をしているのかを知る必要がある。そこで、本研究では商業規模の種苗生産を行い、その飼育水を定量的・定性的に解析し、その細菌群集構造を、従来法とは異なり、分子生

物学的な手法を用いて調査することにした。

試料および方法

試験期間および場所 2004年5月22日から6月27日まで、和歌山県西牟婁郡すさみ町の近畿大学水産研究所すさみ事業場でマダイ *Pagrus major* の種苗生産を行い、その飼育水を観測した。観測期間は受精卵の収容日からふ化後35日目までとした(第二飼育棟は28日目で終了した)。どちらの水槽も観測は同じ日に開始した。水槽は、すさみ事業場の第一飼育棟と第二飼育棟のそれぞれ1水槽ずつ、合計2水槽を観測した。どちらの水槽も角型コンクリート水槽であり、底面積は同じである。第一飼育棟の水槽は有効水深が1m、水量が30kLである。第二飼育棟の水槽は有効水深が1.6mであり、水量が50kLである。

種苗の飼育 両方の水槽に、同じマダイ受精卵を収容密度が水量1kLにつき15000粒となるように収容した。種苗の飼育は流水飼育で行い、受精卵収容日に1日あたり総水量の30%を換水し、その後段階的に換水率を増していった。シオミズツボウムシ *Brachionus rotundiformis* (ワムシ) の給餌をふ化後3日目から開始し、同時にナノクロプシス *Nannochloropsis* sp. を飼育水に添加した。両方の水槽に同じ生物餌料を給餌した。

種苗の生残数の計数 飼育水の観測期間中に種苗の生残尾数の推定を行った。飼育水槽の3点(注水付近とその対角の点および中央部)で飼育水を柱状に採水し、採水された水量と試料中の種苗の尾数から水槽内の種苗の総数を推定した。柱状採水による生残尾数の推定はふ化後4, 7, 14, 21および28日目の夜間に実施した。試験の最終日は、種苗を取り上げて生残尾数を計数した。第

一飼育棟では飼育水を減水して種苗を集め、プラスチック製容器で種苗をすくい、隣接する水槽に移した。このとき容器で種苗を掬い取った回数を数えておいた。途中で一掬い当たりの容器に入る種苗の数を計数し、その値に掬い取った回数を掛け生残尾数とした。第二飼育棟では、種苗を集めた後、ポリカーボネイト製の水槽に移し水量を30 Lに調節した。これをよく攪拌してからその内1 L分の種苗を計数し、総生残数を求めた。

試料の採取および分析 試料は注水および飼育水を毎日1回定時(14時)に採取した。飼育水の試料は飼育水槽内の4点から採水した。飼育水槽の4点は、注水付近の表層: AS, 注水付近の底層: AB, 注水から最も遠く対角の表層: BS, 同底層: BBである。底層は水槽底面の15 cm上とした。

測定した物理・化学的項目は水温, pH, 溶存酸素濃度(DO: dissolved oxygen), アンモニア態窒素濃度(NH₄-N)および溶存態有機炭素濃度

(DOC: dissolved organic carbon)である。pHおよびDOは、酸素瓶に試料水を気泡が混入しないよう静かに採水し、静かに攪拌しながらpH/DOメーター(堀場製作所 D-25)を使用して測定した。NH₄-NおよびDOC用の試料はポリプロピレン製の容器に採水した後、分析するまで凍結保存(-20℃)した。凍結しておいた飼料は解凍した後、ガラス繊維ろ紙(Whatman GF/F)でろ過し、ろ液を分析した。NH₄-Nの測定はインドフェノール法で行い、DOCの測定はTOC(total organic carbon)アナライザー(島津製作所 TOC500)を使用して行った。

生物学的な測定項目として総細菌数および細菌群集構造を解析した。採水した試料を20%パラホルムアルデヒド-PBS溶液で固定(終濃度2%)した。固定した試料に核酸染色剤である4,6-diamino-2-phenyl-indole (DAPI)を添加して細菌細胞の核酸(DNA)を染色した。落射型蛍光顕微鏡で試料を鏡し、DAPI染色された細胞の数を任意の10視野以上から、計数値の合計が300以上となるように計数して総細菌数とした。細菌群集構造の解析は、FISH (fluorescence *in*

situ hybridization) 法にて行った。FISH法に使用したオリゴヌクレオチドプローブ(プローブ)は、 α -Proteobacteria (α グループ)を対象としているALF1b (5'-CGTTCGYTCTGAGCCAG-3'), β -Proteobacteria (β グループ)を対象としているBET42a (5'-GCCTTCCCACCTTCGTTT-3'), γ -Proteobacteria (γ グループ)を対象とするGAM42a (5'-GCCTTCCCACATCGTTT-3')¹⁾およびCytophaga-Flavobacteriumのグループ(CFグループ)を対象とするCF319a (5'-TGGTCCGTGTCTCAGTAC-3')²⁾である。いずれのプローブも5'末端を蛍光色素Cy3にて蛍光標識した。ハイブリダイゼーションは42℃で20時間行い、洗浄は48℃で15分行った。³⁾細菌群集構造はDAPIの蛍光を計数した視野と同じ視野についてCy3の蛍光の数を計数した。総細菌数に対する各プローブで標識できた細胞の数の割合を求め、細菌群集構造とした。4種類のプローブの標識率の合計と100%(総細菌数)の差をunknownとした。

結果

種苗の生残 最数的な種苗の生残率は、第一および第二飼育棟でそれぞれ、37.3%, 11.4%であった(Fig. 1)。第一飼育棟の水槽では種苗の大量へい死は見られなかった。一方の第二飼育棟の水槽では日令14日目以降に、疾病の発生が原因と見られる種苗の大量へい死が発生した。第二飼育棟の観測は、ふ化後28日目の時点で終了した。

物理・化学的項目 飼育水の物理・化学的項目の測定結果をTable 1に示した。水温, pH, DOおよびDOCの値は第一飼育棟と第二飼育棟の間に大きな差はなかった。NH₄-Nは第二飼育棟の値が第一飼育棟の値よりも低くなった。

総細菌数 注水および飼育水の総細菌数の変動をFig. 2に示した。注水中の総細菌数は第一飼育棟および第二飼育棟において同じ様に変動した。飼育水中の総細菌数も第一飼育棟の水槽と第二飼育棟の水槽では同じ様に変動していた。

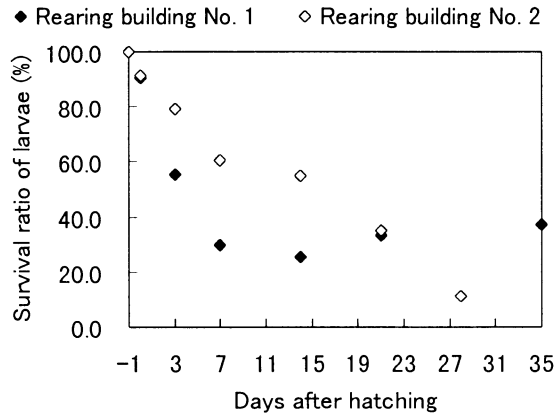


Fig. 1 Survival ratio of larvae.

Table 1 Physical and chemical factors of the rearing water.

	Tank	Average	Minimum	Maximum
Water temperature (°C)	No. 1	21.1	19.8	22.7
	No. 2	21.3	19.6	22.9
pH	No. 1	8.19	7.95	8.35
	No. 2	8.25	8.15	8.33
DO (mgO ₂ /L)	No. 1	7.04	5.78	9.38
	No. 2	6.83	5.95	7.50
NH ₄ -N (mgN/L)	No. 1	0.19	0.03	0.39
	No. 2	0.12	0.05	0.19
DOC (mgC/L)	No. 1	3.30	1.71	5.24
	No. 2	2.91	1.62	4.72

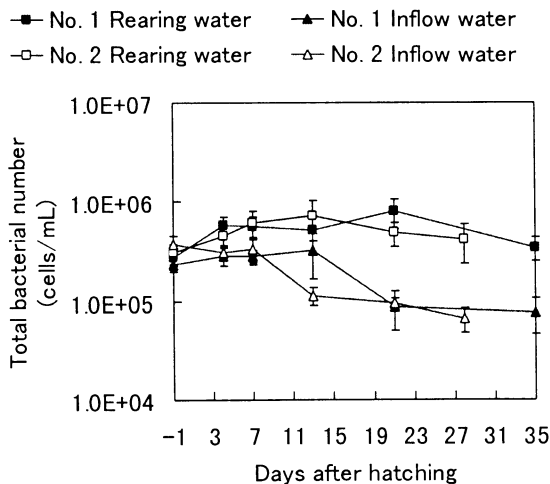


Fig. 2 Changes of total bacterial number in the inflow water and rearing water. No. 1: rearing building No. 1, No. 2: rearing building No. 2. Vertical bars indicate standard deviation.

細菌群集構造 注水中の細菌群集構造は第一飼育棟と第二飼育棟はどちらも似た構造をしており、比較的安定していた（データ未表示）。飼育水の細菌群集構造は、観測初日の時点においてどちらの水槽も同じであった。その後、細菌群集構造の変動の様子が第一飼育棟と第二飼育棟では異なった（Fig. 3）。第一飼育棟の細菌群集構造は、試験期間中を通して比較的安定していたのに対し、第二飼育棟では劇的な変化が起きた。第二飼育棟の飼育水では一時的にγグループが優占した状態になった。

考察

第一飼育棟と第二飼育棟はどちらも同じ受精卵を収容し、同じ餌を与えていたにもかかわらず最終的な種苗の生残率が異なった。ふ化後7日目まではどちらの水槽においても種苗が減耗していた様子であった。この減耗には、受精卵の質が大きく関与しており、この初期段階の減耗を飼育環境の影響から説明することは難しい。

飼育水の物理・化学的項目の値は、どちらの水槽も問題の無い範囲であり、14日目以降、第二飼育棟でのみ大量へい死が発生した理由は飼育水の物理・化学的環境には見あたらない。第二飼育棟のNH₄-Nの値が第一飼育棟の値よりも低い理由は、大量へい死の発生の間、給餌量を制限していたことに依るのであろう。

第二飼育棟の水槽では14日目頃から種苗の大量へい死が発生し、大量のへい死個体が回収された。回収されたへい死個体内の、14日目と21日目のへい死個体について細菌の検出を近畿大学水産研究所に依頼した。14日目のへい死個体内臓からは、何も検出されず、21日目のへい死個体内臓からはビブリオ属の細菌群が検出された。最終的な種苗のへい死の原因はビブリオ属の細菌の感染によるのかもしれない。14日目のへい死個体からは、ビブリオ属の細菌群が検出できなかったことから、何らかの理由で種苗の活力が低下し、その後ビブリオ属の細菌に感染したと考えられる。

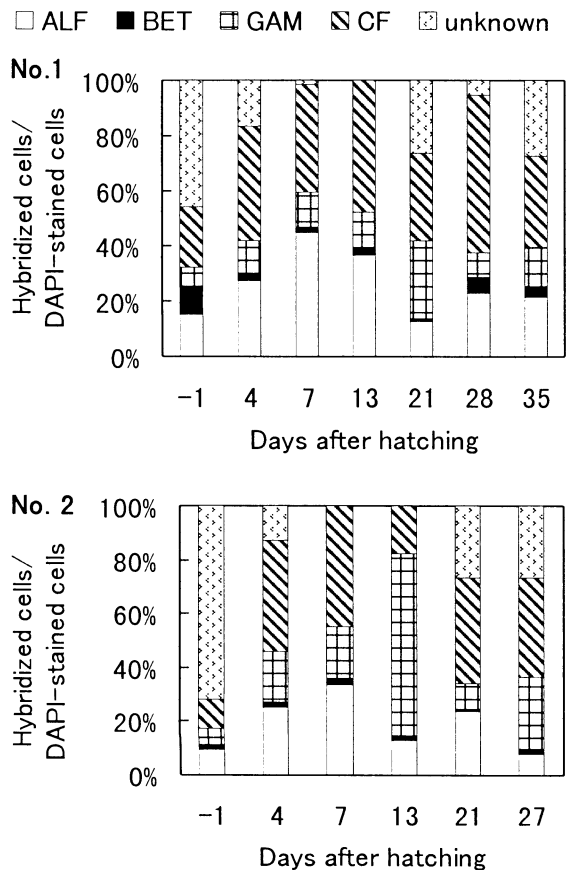


Fig. 3 Changes of bacterial community structure of the rearing water. Upper is No.1, lower is No. 2. Open bar: ALF1b, solid: BET42a, square: GAM42a, hatched: CF319a, stippled: unknown. Unknown indicates the cells which were stained with DAPI and not detected by the probes used in this study.

種苗の大量へい死が発生した第二飼育棟の水槽では、大量へい死発生前に γ グループの細菌群が飼育水の中で非常に優占した状態になっていた。ビブリオ属の細菌群は γ グループに属する。ヨーロッパヘダイ *Sparus aurata* のへい死個体から分離される細菌について調べた例では、へい死個体からもっとも多く検出される細菌はビブリオ属の細菌群であるとしている。⁴⁾ もちろん、 γ グループの細菌の優占と、種苗の大量へい死が偶然重なったという可能性は否定できない。

いずれにしても、飼育水中の細菌群集構造の変化が種苗の生残に強く影響していることは間違いない。大量へい死の起きなかった水槽の細菌群集構造は比較的安定しており、細菌群集構造が短期間に大きく変動した飼育水では種苗生産は成功し

なかった。これは、種苗生産の成功には細菌群集構造の安定性が必要だということを示している。

今後は、細菌群集の構造を安定させるにはどの様にすればよいのか、安定させている要因は何であるかを検討することが必要だと考える。細菌群集構造を安定させる手法が決定できれば、それが安定して種苗生産を行うための重要な技術となるに違いない。これまで種苗生産は、生産技術者の勘や経験に依存していた部分が大きく、普遍的なマニュアルが存在していなかった。微生物生態学的な見地から飼育水を制御する方法を提案できれば、それが普遍的なマニュアルの作成と、種苗生産のさらなる安定化の一助となるはずである。

謝辞

近畿大学水産研究所の宮下盛教授ならびに、中川至純博士には、現場実験の遂行にあたり協力と助言をいただいた。また、同水産養殖種苗センター白浜事業場およびすさみ事業場の諸氏には種苗の飼育において協力をいただいた。ここに深く感謝の意を表す。

文献

- 1) Manz W, Amann R, Ludwig W, Wagner M, Schleifer KH. Phylogenetic oligodeoxynucleotide probes for the major subclasses of Proteobacteria: problems and solutions. *Syst. Appl. Microbiol.* 1992; **15**: 593-600.
- 2) Manz W, Amann R, Ludwig W, Vancanneyt M, Schleifer KH. Application of a suite of 16S rRNA-specific oligonucleotide probes designed to investigate bacteria of the phylum cytophaga-flavobacter-bacterioides in the natural environment. *Microbiology* 1996; **142**: 1097-1106.
- 3) Zarda B, Hahn D, Chatzinotas A, Schonhuber W, Neef A, Amann R, Zeyer J. *Arch. Microbiol.* 1997; **168**: 185-192.
- 4) Zorrilla I, Chabrillon M, Arijo S, Diaz-Rosales P, Martinez-Manzanares E, Balebona MC, Morinigo MA. *Aquaculture* 2003; **218**: 11-20.