

## イシダイ仔稚魚の腸内細菌相

石丸克也・山本眞司・村田 修・熊井英水

### Intestinal Bacterial Flora of Farmed Japanese Parrotfish, *Oplegnathus fasciatus* at Larval and Juvenile Stages

Katsuya ISHIMARU\*, Shinji YAMAMOTO\*, Osamu MURATA\*, and Hidemi KUMAI\*

The aerobic bacterial flora of Japanese parrotfish at larval and juvenile stages were investigated in relation to the microflora of diets and ambient water. After the commencement of feeding with rotifer and *Artemia*, microflora of the fish was dominated by *Vibrio/Photobacterium* followed by *Alcaligenes* and *Moraxella/Acinetobacter*. Gram-positive bacteria were frequently isolated from fish thereafter when their feed was changed to artificial diets. Predominating genera of water and live diets were *Moraxella/Acinetobacter*, *Alcaligenes*, and *Vibrio/Photobacterium*, while those of artificial diets were Gram positive bacteria such as *Micrococcus* or *Corynebacterium*. These results indicate that Gram-positive bacteria in fish intestine were derived from artificial diets, and that the intestinal flora of the fish in early developmental stages were influenced by the microflora of ingested foods.

Key words: Japanese Parrotfish, intestinal microflora

イシダイ, *Oplegnathus fasciatus* は昭和 42 年に近畿大学水産研究所が初めて完全養殖に成功して以来<sup>1)</sup>, 人工種苗による養殖が行われている。しかし腸管内の局所的細菌感染やウイルス性神経壊死症など, 仔稚魚期特有の疾病による大量斃死のために養殖種苗の安定生産には至っていない。

近年初期飼育における疾病対策として, 飼育水および腸管内の正常細菌相の安定化や, 抗微生物活性をもつ細菌の投与が検討されている。既にニジマス, *Oncorhynchus mykiss*<sup>2)</sup> やマツカワ, *Verasper moseri*<sup>3)</sup> など一部の魚種では一定の成果が報告されており, さらに多くの魚種への応用が期待される。

本研究では細菌相の制御に際して必要となる基礎的知見を得る目的で, 成長にともなうイシダイの細菌相の変化を調査するとともに, 飼育水および餌飼料の細菌相との関連についても検討した。

---

\* 白浜実験場 (Fisheries Laboratory, Kinki University, Shirahama, Wakayama, 649-2211, Japan)

## 材料および方法

イシダイは近畿大学水産研究所の養成親魚から自然産卵で採取した卵を育成したものをを用いた。1998年5月27日に受精卵1万粒を收容し、同年10月21日までの147日間調査を行った。飼育には500l容円形水槽を用いた。飼育水として殺菌していない濾過海水を用い、3日令までは止水で管理し、以後は流水飼育とした。3日令から39日令までS型ワムシ、*Brachionus plicatilis* (以下ワムシ)、21日令から39日令までアルテミア、*Artemia* sp. 幼生を給餌し、34日令以降は配合飼料を与えた。また、ワムシの給餌期間中はナノクロロプシス、*Nannochloropsis oculata* 培養液を毎朝飼育水100lあたり1l添加した。調査期間中の水温は22.2~31.0°Cであった。

イシダイからの細菌の分離は1~15日令は毎日、42日令までは3日に1度、91日令までは1週間に1度、その後は2週間に1度行った。卵は20個、仔稚魚は1~24日令は20尾、27~56日令は5尾をプールして1検体とし、63日令以降は個体別に3尾から細菌の分離を試みた。供試魚は朝の給餌前に採取した。仔稚魚の供試部位は30日令までは全魚体、33~63日令は腎臓を除く全ての内臓、70日令以降は腸管のみとした。試料は0.1%塩化ベンザルコニウム中に1分間浸漬して消毒した後、水道水で30秒間洗浄して用いた。飼育水、ナノクロロプシス培養液、ワムシおよびアルテミアについてもイシダイと同時に採材した。配合飼料は調査期間中に給与した全ての製品の各サイズについて1ないし2回細菌の分離を行った。

全ての試料は滅菌海水とともにホモジナイズし、滅菌海水で10倍段階希釈した後ZoBell 2216E寒天培地に塗抹した。塗抹後、25°Cの好气的条件下で3日間培養し、発育したコロニーから各試料毎にランダムに20個を選択した。最低希釈率の培地における発育コロニー数が20に満たない場合はその全てを供試した。選択した菌株は全菌体のSDS-PAGEにより同一のタンパク質プロファイルを持つ群に分類した後、各群の代表株を楠田・浜口<sup>4)</sup>の方法に従って同定した。

## 結 果

**イシダイ** イシダイ受精卵の細菌数は検出限界以下であった。仔稚魚の細菌数は開口時の $4.3 \times 10^2$  CFU/尾から39日令の $3.6 \times 10^6$  CFU/尾まで次第に増加したが、42日令から91日令までは $10^3 \sim 10^7$  CFU/尾と大きく変動した。105日令以降は $10^2 \sim 10^4$  CFU/gであった。

細菌相は表1に示した。摂餌開始の翌日となる5日令より*Vibrio/Photobacterium*が優勢となり*Alcaligenes*, *Moraxella/Acinetobacter*もしばしば分離された。完全に配合飼料に切り替えた39日令以降、細菌相は調査毎に大きく異なり特定の菌が優勢になることはなかったが、147日令には再び*Vibrio/Photobacterium*が優占した。

**飼育水** 調査期間中の飼育水の細菌数は $10^3 \sim 10^5$  CFU/mlであった。細菌相は表2に示したように調査毎に変動したが、主要な菌群は*Moraxella/Acinetobacter*, *Alcaligenes* および *Vibrio/Photobacterium* であった。

**ナノクロロプシス培養液** ナノクロロプシス培養液の細菌数は $10^5 \sim 10^8$  CFU/mlであった。細菌相は表3に示した。*Moraxella/Acinetobacter*, *Alcaligenes* の他、同定図式に該当しない菌が多数分離された。

Table 1. Percentage bacterial flora of larvae and juveniles of Japanese parrotfish

Days after hatching	Flora (%)												
	<i>Vibrio - Photobacterium</i>	<i>Moraxella - Acinetobacter</i>	<i>Aeromonas - Plesiomonas</i>	<i>Alcaligenes</i>	<i>Acinetobacter</i>	<i>Pseudomonas</i>	Enterobacteriaceae	<i>Flavobacterium</i>	<i>Bacillus</i>	<i>Micrococcus</i>	<i>Staphylococcus</i>	<i>Corynebacterium</i>	others
0													
1	20	60			20								
2					33								67
3	20												80
5	95	5											
6	100												
7	95				5								
8	100												
9	95				5								
10	58	26			11								5
11	50	10	40										
13	100												
14	75	25											
15	100												
18	100												
27	100												
30	80	15											5
33	85	15											
36	100												
39	100												
42	25					75							
49	5				95								
56	40		60										
63	39	5			21		12	2	19		2		
70	70		26					4					
77	30				2		7		56				5
84	5						65						30
91	42	28				2	7	16	3	1			
105	42	5	9	3		3	19			18			
119									17		83		
133	38	4			7		1		20		26		4
147	90				10								

ワムシ ワムシの細菌数は  $10^8 \sim 10^9$  CFU/g であった。細菌相は表 4 に示したように大きく変動したが、*Moraxella/Acinetobacter* および *Vibrio/Photobacterium* がしばしば優占していた。

アルテミア アルテミアの細菌数は  $10^7 \sim 10^8$  CFU/g であった。細菌相は表 5 に示したが、*Vibrio/Photobacterium* が優占していた。

配合飼料 配合飼料の細菌相は表 6 に示したとおりで、細菌数はいずれも  $10^2 \sim 10^4$  CFU/g であった。製品によって異なるが、*Micrococcus* および *Corynebacterium* が優勢で、他の試料に高頻

Table 2. Percentage bacterial flora of rearing water

Days after hatching of the fish	Flora (%)												
	<i>Vibrio - Photobacterium</i>	<i>Moraxella - Acinetobacter</i>	<i>Aeromonas - Plesiomonas</i>	<i>Alcaligenes</i>	<i>Acinetobacter</i>	<i>Pseudomonas</i>	Enterobacteriaceae	<i>Flavobacterium</i>	<i>Bacillus</i>	<i>Micrococcus</i>	<i>Staphylococcus</i>	<i>Corynebacterium</i>	others
0	5	60		20			5						10
1		45		50									5
2		75		15									10
3	5	70		5		5							15
5		60		15								5	20
6	5	35		35		5	5						15
7	35	18		18								6	24
8	25	31		13			19						13
9	25	40		25						10			
10	10	70		5			5						10
11	75	15		10									
12	15	15											70
13		35		10									55
14	20	65	15										
15													100
18		45		5			50						
21	15	65	15										5
24	5	30		15	5		10						35
27		65		25									10
30	60	5	5			30							
33		90											10
36	80			20									
39	44	19					6		6				25
42	40						50						10
49	60			10	15								15
56	56	11		33									
63	20	20		45		5	5				5		
70	11	78				6							6
77		24		59		12		6					
84	11	79					5						5
91	60	40											
105	10			90									
119	50	22		17									11
133	26			74									
147		37		47									16

度に見られる *Vibrio/Photobacterium* は全く分離されなかった。

Table 3. Percentage bacterial flora of *Nannochroloopsis oculata*

Days after hatching of the fish	Flora (%)												
	<i>Vibrio - Photobacterium</i>	<i>Moraxella - Acinetobacter</i>	<i>Aeromonas - Plesiomonas</i>	<i>Alcaligenes</i>	<i>Acinetobacter</i>	<i>Pseudomonas</i>	Enterobacteriaceae	<i>Flavobacterium</i>	<i>Bacillus</i>	<i>Micrococcus</i>	<i>Staphylococcus</i>	<i>Corynebacterium</i>	others
3		55						5					40
5	90	5					5						
6		89		11									
7	10	55		5								5	25
8		15											85
9		75	5	10				10					
10		53									11		37
11		25		10									65
12	50	7		14							7		21
13	15	20		20			5				30		10
14	5	5										5	84
15	20	25		25			30						
18		5		15		60				5			15
21		32		5		5						16	42
24		20					5						75
25		35		45									20
27		5		37		11	42					5	
28		10		5						5			80
29		100											
30		11	21	16			16					11	26
31		35										10	55
32		80		15									5
33		6											94

## 考 察

表1~6に示したように、イシダイ仔稚魚の腸内細菌相は生物餌料の給与開始とともに *Vibrio/Photobacterium* が優占した。しかし配合飼料への転換後、細菌相は調査毎に大きく変動しはじめ、*Micrococcus* や *Corynebacterium* がしばしば見られるようになった。*Micrococcus* および *Corynebacterium* は飼育水や生物餌料からは分離されず、稚魚の腸管と配合飼料から共通のタンパク質プロファイルを持つ菌群が分離されていることから、これらのグラム陽性菌は給与した配合飼料に由来すると考えられた。

魚類の消化管内細菌相は環境水や餌料の影響を受けながらも独自の選択の結果成立しており、海産魚では特定種の *Vibrio* が優勢であることが報告されている<sup>5)</sup>。また、瀬良・木俣<sup>6)</sup>は体重65~95gのマダイ、*Pagrus major* およびチダイ、*Eyynnys japonica* を用いて、給与するモイスト飼料の組成が腸内細菌相にほとんど影響しないことを示した。本研究においては配合飼料給与によって腸内細菌相の大きな変動が観察されたが、その理由として体重数gの稚魚期には魚体側の

Table 4. Percentage bacterial flora of rotifer

Days after hatching of the fish	Flora (%)												
	<i>Vibrio</i> - <i>Photobacterium</i>	<i>Moraxella</i> - <i>Acinetobacter</i>	<i>Aeromonas</i> - <i>Plesiomonas</i>	<i>Alcaligenes</i>	<i>Acinetobacter</i>	<i>Pseudomonas</i>	Enterobacteriaceae	<i>Flavobacterium</i>	<i>Bacillus</i>	<i>Micrococcus</i>	<i>Staphylococcus</i>	<i>Corynebacterium</i>	others
3				75									25
5	10	25		10		30							25
6	75	5		15			5						
7	35	15		25			5						20
8	30	35		35									
9	39			22									39
10				11			11						79
11	35	30					5						30
12	5	10		15			70						
13	45	30					25						
14	35						65						
15	10	45											45
18	40	30		15			5						10
21		75		10									15
24	15	50											35
27	11	39		17				17					17
28	26	17					57						
29		15											85
30		40											60
31	30	40		25									5
32	10	25					55						10
33		60											40
34	20	70		5									5
35	5	85					10						
36		67					11						22
37	25	60		10									5
38	25	60											15

細菌相選択機構が未完成であったこと、未だ安定した細菌相が形成されていなかったことなどが考えられる。いずれにしてもこの時期のイシダイ稚魚腸管内において、通常海水環境中に存在しない菌種であっても一時的には優勢となりうることを示された。本研究の結果、有用細菌の検索に当たって広く様々な菌種が候補となりうることを、細菌の経口投与による腸内細菌相の制御が可能であることが示唆された。

要 約

成長にともなうイシダイ仔稚魚の腸内細菌相の変化を調査するとともに、飼育水および餌飼料

Table 5. Percentage bacterial flora of *Artemia salina*

Days after hatching of the fish	Flora (%)												
	<i>Vibrio</i> - <i>Photobacterium</i>	<i>Moraxella</i> - <i>Acinetobacter</i>	<i>Aeromonas</i> - <i>Plesiomonas</i>	<i>Alcaligenes</i>	<i>Acinetobacter</i>	<i>Pseudomonas</i>	Enterobacteriaceae	<i>Flavobacterium</i>	<i>Bacillus</i>	<i>Micrococcus</i>	<i>Staphylococcus</i>	<i>Corynebacterium</i>	others
21	75	5		10			10						
24	90	10											
27	100												
29	100												
30	100												
33	90	10											
36	95	5											

Table 6. Percentage bacterial flora of artificial diets

Product code and size	Flora (%)												
	<i>Vibrio</i> - <i>Photobacterium</i>	<i>Moraxella</i> - <i>Acinetobacter</i>	<i>Aeromonas</i> - <i>Plesiomonas</i>	<i>Acinetobacter</i>	<i>Alcaligenes</i>	<i>Pseudomonas</i>	Enterobacteriaceae	<i>Flavobacterium</i>	<i>Bacillus</i>	<i>Micrococcus</i>	<i>Staphylococcus</i>	<i>Corynebacterium</i>	others
A, No.2		5			30					20		40	5
A, No.4		5							5	75		15	
A, No.5		10								90			
B, No.2		89											11
B, No.4		5							5			80	10
C, No.6		5					10			80	5		
C, No.6										100			
C, No.7										78		22	
C, No.7									6	24	18	53	

の細菌相との関連について検討した。イシダイ仔稚魚の腸内細菌相は生物餌料の給与開始とともに *Vibrio/Photobacterium* が優占したが、配合飼料への転換後は *Micrococcus* や *Corynebacterium* が高頻度に分離された。これらのグラム陽性菌は給与した配合飼料に由来すると考えられた。

## 謝 辞

本研究の実施にあたり、多大なる御協力をいただいた水産研究所白浜実験場の職員各位に厚く

お礼申し上げます.

## 文 献

- 1) 熊井英水 (1984) : イシダイの養殖生物学的研究. 近畿大学水産研究所報告, (2), 1-127.
- 2) Yoshimizu, M., Y. Fushimi, K. Kouno, C. Shinada, Y. Ezura, and T. Kimura (1992) : Biological control of infectious hematopoietic necrosis by antiviral substance producing bacteria, in "Salmonid Diseases" (ed. by T. Kimura), Hokkaido University Press, Sapporo, pp.301-307.
- 3) Watanabe, K., S. Suzuki, T. Nishizawa, K. Suzuki, M. Yoshimizu, and Y. Ezura (1998) : Control strategy for viral nervous necrosis of barfin flounder. *Fish Pathology*, 33 (4), 445-446.
- 4) 楠田理一・浜口昌己 (1988) : クロマグロの腸内細菌相. 水産増殖, 36 (2), 97-101.
- 5) 瀬良 洋・石田祐三郎 (1975) : 魚類消化管内のマイクロフローラ形成について. 微生物の生態 2 相互作用をめぐって (日本微生物生態学会編) 学会出版センター, 東京, pp.53-70.
- 6) 瀬良 洋・木俣正夫 (1972) : 海産魚類消化管の細菌相 - I. マダイ・チダイの細菌相に及ぼす餌料成分の影響. 日本水産学会誌, 38 (1), 50-55.