

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 13 日現在

機関番号：34419

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2009～2013

課題番号：21380127

研究課題名(和文) 種苗生産における「水作り」の微生物生態学的な解析とマニュアル化

研究課題名(英文) Microbial ecological research and bio-control of rearing water for fish seedlings

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) 8,400,000円、(間接経費) 2,520,000円

研究成果の概要(和文)：種苗生産では経験的に微細藻類を飼育水に添加し、仔稚魚減耗の低減化を図る。これを海外ではGreen Water(水作り)と呼ぶ。本研究では、そのメカニズムを微生物生態学的側面から科学的に検証した。その結果、活発に増殖する微細藻類の培養液中に善玉菌(Roseobacterグループ)が質的(多種類)にも量的にも多く存在し、微細藻類と善玉菌が協働して、悪玉菌(例えばVibrio属の魚病細菌)の増殖を特異的に抑制し、時には死滅させることが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：Green microalgae such as *Nannochloropsis oculata* are widely used for fish seedlings in aquaculture industry as Green Water. In this study, the abundance of Roseobacter clade is being focused, as some strains are known to produce inhibitory substances against fish pathogenic bacteria. In *N. oculata* culture, Roseobacter clade (RCA) were various and came to be abundant. Interestingly, the combination of Roseobacter clade and phytoplankton reinforced the killing effect of RCA against some *V. anguillarum*.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：水産学一般

キーワード：種苗生産 微生物 微細藻類 グリーンウォーター 水作り 善玉菌 微生物生態学

### 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 Green Water と呼ぶ。この「水作り」は現場の飼育者の経験に基づいており、職人芸的な側面を持つ。

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を形成している(以下、便宜的に飼育水生態系と呼ぶ)。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3つのステージに分けることが出来る。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ワムシ(以下ワムシ)が共存する状態、3) ワ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、仔稚魚とワムシとアルテミア幼生が共存する状態、である。その後、必要に応じて配合飼料、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。「水作り」ではこの3つのステージに応じた工夫が必要になる。ここでは、特に前半の2つのステージでの Green Water 効果に注目する。

微細藻類の添加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、仔魚の餌生物のワムシが微細藻類を捕食することで栄養価があがる、飼育水の水質環境が良くなる。更に、従来から言及されながらも明らかにされていなかったのは『微細藻類と細菌群との関係』である。例えば、マダイ及びマールブルゴビー(中華料理の高級食材として東南アジアで養殖)の飼育水中で *-* プロテオバクテリアが優占すると仔魚の大量斃死が起こり易く、*-* プロテオバクテリアや *Cytophaga-Flavobacterium* グループが優占すると大量斃死は起こらない (*Fisheries Science* 73: 784-791, 2007)。*-* プロテオバクテリアや *Cytophaga-Flavobacterium* グループはそもそも微細藻類との相性が良く、ナンノ培養液でも優占し (*Fisheries Science* 73: 541-547, 2007)。天然の沿岸海水中でもしばしば優占する。一方、*-* プロテオバクテリアはワムシ等の培養液で優占する傾向がある。飼育水生態系では、通常の天然海水と同じレベル(10%以下)に *-* プロテオバクテリアの存在比率を抑えることが良い「水作り」につながる。従って、飼育水に投入される前のワムシ等の培養槽での細菌群の制御も重要になる。

### 2. 研究の目的

(1) 微細藻類(ナンノ)の培養液中における細菌群集の動態を解析する: ナンノ培養液が悪玉菌(ピブリオ属の魚病細菌)の増殖を阻害する傾向は確認しているが、実際のナンノ培養槽内におけるピブリオ属細菌群の動態は明らかになっていない。マイクロコズム実験系により、ナンノ培養槽内の細菌群集の動態を明らかにする。

(2) ナンノと善玉菌が悪玉菌(魚病細菌 *Vibrio anguillarum*)を制圧するときに作用する協働メカニズムを解明する: ナンノの培養液の細菌群集構造を解析し、悪玉菌の増殖を阻害する善玉菌をできるだけ単離する。単離した複数種の善玉菌を用いて、様々な環境条件での悪玉菌への影響を評価し、増殖阻害のメカニズムを明らかにする。

(3) ナンノ以外の微細藻類の殺滅効果を評価する: ケイ藻類の他、種苗生産でもっともよく用いられている市販の淡水クロレラと海産クロレラについて、ナンノと同様の効果があるのかを検証する。

(4) 悪玉菌の違いに伴う善玉菌の殺滅効果の変化を明らかにする: 魚病細菌 *V. anguillarum* は血清型の違いにより、魚毒性が大きく変化する。善玉菌の殺滅効果が、この病原性の違いにより変化するの否かを明らかにする。

### 3. 研究の方法

(1) マイクロコズム実験: 海水試料 80 L を、2009年11月10日に和歌山県白浜近畿大学水産研究所棧橋において、バンドン採水器を用いて3m深度より採取した(水温 21.5 °C)。大型動物プランクトンを除くため、目合 200 µm ナイロンメッシュで前ろ過した。ナンノ培養液は、近畿大学水産研究所水産養殖種苗センターすさみ事業場より提供していただいた。ナンノは、開放系の屋外水槽で14日間培養していたもので、細胞数はおよそ  $3 \times 10^7$  cells mL<sup>-1</sup>であった。

海水試料 20 L とナンノ培養液を、20 L 容ポリカーボネートタンク(高さ約 60 cm、横幅約 30 cm)に入れた。ナンノの細胞数を、トーマス血球計算盤で計数し、 $10^5$  cells mL<sup>-1</sup>となるように添加した。ナンノのブルームを誘引するために、NaNO<sub>3</sub> (44.1 µM) および NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (4.4 µM) を添加した。実験はタンク2基で行い、それぞれ Tank 1、Tank 2 とした。スターラ で攪拌しながら、20 恒温室で、明暗周期 12 h: 12 h、照度約 4,000 Lux (昼白色蛍光灯) で 14 日間行った (Day 0~Day 14)。ナンノの動態をリアルタイムで観察するため、蛍光光度計 (TD-700、TURNER DESIGNS 社) を用いて生体内蛍光をモニターした。

(2) 細菌数の計数: TCBS 寒天培地と ZoBell 培地を使用する寒天平板法、落射型蛍光顕微鏡を用いる直接検鏡法及び定量的 PCR 法で計数した。

(3) DNA 抽出：試料からの DNA 抽出はキサントゲン酸塩-SDS DNA 抽出法 (Daniel Tillett & Brett A. Neilan, 2000.) を用いた。水試料、生物試料の各フィルターをカットし 2 mL ねじ口式チューブに入れた。キサントゲン酸 Buffer (10% Xanthogenate : 21 mg, 1 M Tris-Cl : 210  $\mu$ L, 0.5 M EDTA : 84  $\mu$ L, 10% SDS : 210  $\mu$ L, 10 M Ammonium acetate : 168  $\mu$ L, H<sub>2</sub>O : 1428  $\mu$ L) を 700  $\mu$ L を、試料の入ったチューブに加えた。激しく攪拌した後 (3 分間) 70 °C で 120 分間インキュベートした。ボルテックスを 10 秒間行い、上澄みを Treff lab 1.5 mL チューブに加え 30 分間氷冷した。再度フィルターの入ったねじ口チューブにキサントゲン酸 Buffer を加え、1 分間ボルテックスし、70 °C で 60 分間インキュベートした後、同様の処理をした。この作業を 3 度繰り返した。遠心分離を 15000 rpm で 10 分間、4 °C で行った。上澄みを新しい Treff lab 1.5 mL チューブに移し、再度 15000 rpm、10 分間、4 °C で遠心分離した。イソプロパノールを 700  $\mu$ L 加え転倒混和してから、-80 °C に 15 分以上静置した。その後、15000 rpm、20 分間、4 °C で遠心分離を行った。その後、70%エタノールで洗浄し、TE Buffer (pH 7.4) 30  $\mu$ L を加え、12 時間以上冷蔵し、DNA を溶解させた。溶解後、DNA 濃度と純度を NanoDrop 分光光度計で測定した。

(4) *Vibrio* 属細菌に特異的なプライマーを用いた PCR：抽出した DNA を *Vibrio* 属細菌に特異的なプライマーセットを用い、PCR 法で DNA を増幅させた。プライマーとしてフォワードに Vib567F-GC (5'-CGC CCG CCG CGC CCC GCG CCC GTC CCG CCG CCC CCG CCC GGG CGT AAA GCG CAT GCA GGT-3' 下線部は GC クランプ)、リバーズに Vib680R (5'-GAA ATT CTA CCC CCC TCT ACA G-3') を使用した。PCR マスターミックス (10 $\times$ Ex Taq buffer : 5  $\mu$ L, dNTP Mixture : 4  $\mu$ L, BSA : 2  $\mu$ L, Vib567F (100 mM) : 0.5  $\mu$ L, Vib680R (100 mM) : 0.5  $\mu$ L, Takara Ex Taq : 0.25  $\mu$ L, H<sub>2</sub>O : 36.75  $\mu$ L) 49  $\mu$ L に DNA 抽出液 1  $\mu$ L (2 ng/ $\mu$ L) を加えて、よく混合し C1000<sup>TM</sup> Thermal Cycler (BIORAD 社) を使用し PCR を行った。PCR を、95 °C : 8 分、(95 °C : 1 分、64 °C : 3 分)  $\times$  35 サイクル、72 °C : 5 分 (サイクル名 : VIBGC) で行った。PCR 増幅産物を 3% アガロースゲルによる電気泳動に供し、DNA 増幅の有無を確認した。

(5) *Roseobacter* 属細菌に特異的なプライマーを用いた PCR：抽出した DNA を *Roseobacter* 属細菌に特異的なプライマーセットを用い、PCR 法で DNA を増幅させた。プライマーとしてフォワードに GC-ROSEO536Rf (5'-CGC CCG CCG CGC CCC GCG CCC GTC CCG CCC CCG CCC GCG GAG GGG GTT AGC GTT G-3' 下線部は GC クランプ)、リバーズに Grb735r (5'-GTC AGT ATO GAG CCA GTR AG-3') を使用した。PCR マスターミックス (10 $\times$ Ex Taq buffer : 5  $\mu$ L, dNTP Mixture : 4

$\mu$ L, BSA : 2  $\mu$ L, GC-ROSEO536Rf (100 mM) : 0.5  $\mu$ L, Grb735r (100 mM) : 0.5  $\mu$ L, Takara Ex Taq : 0.25  $\mu$ L, H<sub>2</sub>O : 36.75  $\mu$ L) 49  $\mu$ L に DNA 抽出液 1  $\mu$ L (2 ng/ $\mu$ L) を加えて、よく混合し、C1000<sup>TM</sup> Thermal Cycler (BIORAD 社) を使用し PCR を行った。PCR を、95 °C : 5 分、(95 °C : 1 分、65 °C : 1 分 [-1 per cycle], 72 °C : 1 分)  $\times$  4、(95 °C : 1 分、65 °C : 1 分、72 °C : 1 分)  $\times$  24 サイクル、72 °C : 10 分 (サイクル名 : ROSGC) で行った。PCR 増幅産物を 3% アガロースゲルによる電気泳動に供し、DNA 増幅の有無を確認した。

(6) DGGE (変性剤濃度勾配ゲル電気泳動) 法：PCR にて DNA 増幅が確認された試料のアガロース電気泳動画像から、画像解析ソフト Image-J を使用して、バンドの蛍光強度を計測した。バンドの蛍光強度から試料中の DNA 濃度を推定した。DNA 量が 100 ng となるようにアプライする試料の量を決定した。変性剤濃度勾配 100% Solution (40% Acrylamide : 50 mL, 50 $\times$  TAE Buffer : 2.5 mL, Urea : 105 g, Deionized formamide : 100 mL) と 0% Solution (40% Acrylamide : 50 mL, 50 $\times$  TAE Buffer : 2.5 mL) を混合して、High Solution (100% Solution : 12 mL, 0% Solution : 12 mL) と Low Solution (100% Solution : 6 mL, 0% Solution : 18 mL) を調製した。変性剤の濃度勾配が 25% ~ 50% となるように High Solution と Low Solution を混合し、8% ポリアクリルアミドゲルを作製した。INGENY phorU- $\alpha$  (Ingeny International BV 社) を使用し、85V、60 °C で 16 時間、電気泳動を行った。電気泳動後、E-Graph WUV-M20 (ATTO 社) を用いて、ゲル撮影を行った。

(7) クラスタ解析：DGGE のゲルを撮影した写真から各試料のバンド数および位置を確認後、2 値化した。Jaccard 指数を用いて、類似度を求めた。Jaccard 指数 =  $N_{AB} / (N_A + N_B - N_{AB})$ 、ここで  $N_A$  と  $N_B$  は A レーンあるいは B レーンの各バンド数、 $N_{AB}$  は両レーンに共通のバンド数である。この類似度を求めて、統計ソフト「R」を用いて群平均法でクラスタ分析を行った

(8) ナノ培養液で優占する善玉菌 (*Roseobacter* 属細菌) の群集構造の解析と同定と単離：ナノ培養液試料を海洋細菌用の寒天平板培地に塗抹し、高い希釈段階でコロニーを形成したもの (優占する培養可能な海洋細菌) を画線法でできる限り単離した。単離した菌株について、*Roseobacter* グループに特異的な蛍光プローブを用いた FISH 法により一次スクリーニングを行い、その後 16S rRNA 遺伝子を PCR 増幅してシーケンス解析を行った。

#### 4. 研究成果

(1) ナノ培養液には従来の報告とは異なる新規な善玉菌が多数存在していた。本研究で単離できた *Roseobacter* グループの善玉菌は *Sufitobacter* sp.、*Thalassobius* sp.、*Antarcto-*

bacter 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かった(図1)。

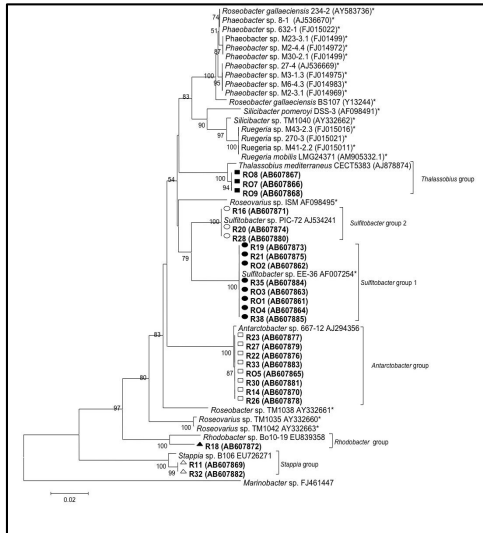


図1. ナンノ培養液から分離した善玉菌 (*Roseobacter* グループ) の系統樹。が本研究で新規に分離した善玉菌

(2) 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ピ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(図2)、ピブリオ属細菌の群集構造が単純化した(論文)。

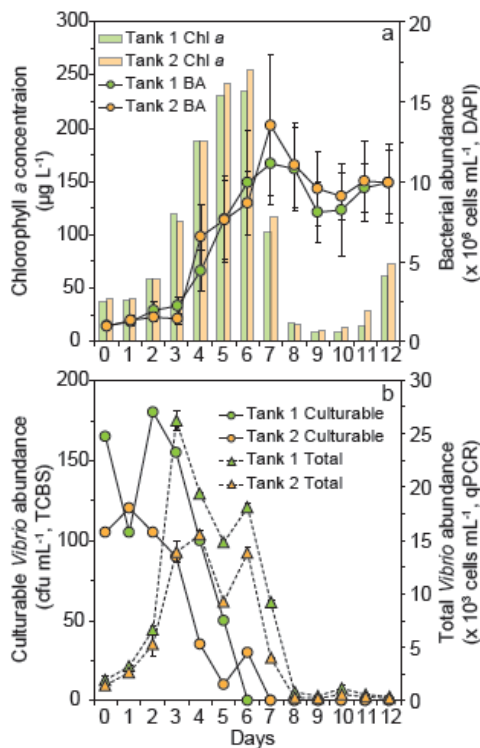


図2. ナンノ培養液中のクロロフィル量とs総細菌数(a)とピブリオ属細菌数(b)の経時変化

(3) ナンノ培養液から分離した善玉菌の

*Sulfitobacter* sp.は、同じ魚病細菌 *V. anguillarum* であっても、病原性の高い血清型への殺滅効果がより高くなった(論文)。

(4) 増殖する海産クロレラをナンノの代わりに Green Water として用いると、ナンノと同様にピブリオ属細菌の増殖を抑制したが、種苗生産でワムシの餌として最も広く用いられている市販の淡水クロレラでは、かえってピブリオ属細菌の増殖を活性化した(論文)。

(5) 同じナンノ培養液から分離した - プロテオバクテリアの *Roseobacter* グループの善玉菌6株 (*Thalassobius* sp. 1株 *Sulfitobacter* sp. 2株、*Rhodobacter* sp. 1株、*Antarctobacter* sp., 1株、*Stappia* sp. 1株) について、*V. anguillarum* を対象として殺滅効果を調べると、いずれの善玉菌も殺滅効果を示すがその様子は異なった(論文)。

(6) *Sulfitobacter* 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”Green Water”のろ液中では、殺滅効果が飛躍的に向上した(ろ液単独の効果は低い)。この善玉菌のピ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った。善玉菌はそれ単独よりも”Green Water”中で、より高い魚病細菌の殺滅効果を発揮した(図3)。これは今までに報告が全くない極めて新規な知見である(論文)。

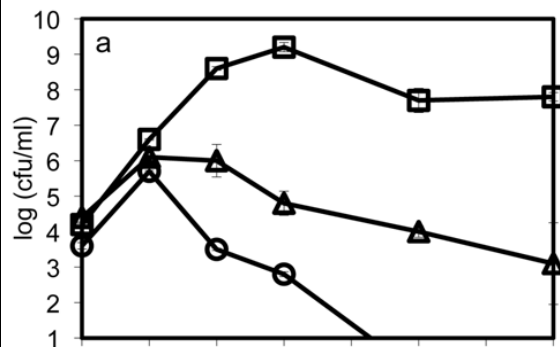


図3. 異なる3つの環境条件において善玉菌 (*Sulfitobacter* sp.) と共存した時の悪玉菌 (*V. anguillarum*) の生菌数の経時変化。□: VNSS (高栄養培地) △: 微細藻類用培地のみ、○: 微細藻類用培地で増殖したナンノの培養液。

(7) 異なる微細藻類で同様の効果を調べたところ、ナンノで特に効果が高く、海産クロレラ *Chlorella vulgaris* でも同様の効果を確認したが(論文)、珪藻の *Chaetoceros neogracile* では明確な Green Water 効果を確認できなかった。

経験的な「水作り」を科学的に解析することで、マニュアル化を可能にするのが本研究

の最終目標である。現時点で微細藻類の利用に関するマニュアルとして明記できる事項は次の2点である。

- (1) 使用する微細藻類には注意すること。微細藻類の種類により、善玉菌効果は期待できない。
- (2) ナンノクロロプシスや海産クロレラ等の微細藻類を海産魚の飼育水に用いる場合、活発に増殖する細胞(後期対数増殖期)を用いること。これは飼育水の光条件を良好にすることがポイントになる。

実際の種苗生産現場では、コスト、ワムシを経由した仔稚魚への栄養効果など、様々な項目を考慮して、水作りのための微細藻類を選択する必要がある。それらを考慮した上で、さらに善玉菌効果を付与した場合、元気のよいナンノクロロプシスを用いることが推奨できる。

本研究では未だ不明な点も多く残されている。例えば、魚病細菌として *V. anguillarum* しか用いていない点、検討した微細藻類が限られている点、Green Water が仔稚魚の健康状態(主に腸内細菌叢)へ及ぼす影響などについては十分に検討できていない。これらの点については、今後さらに研究を継続し、マニュアルの完成度を高める必要がある。

#### 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4件)

Emilia Noor Sharifah and Mitsuru Eguchi.

Mixed cultures of the phytoplankton *Nannochloropsis oculata* and the marine bacterium *Sulfitobacter* sp. RO3 inhibit the growth of virulent strains of the major fish pathogen *Vibrio anguillarum*. *Aquaculture Science* **60**: 39-45 (2012). 査読有

Emilia Noor Sharifah and Mitsuru Eguchi.

Benefits of live phytoplankton, *Chlorella vulgaris*, as a biocontrol agent against fish pathogen *Vibrio anguillarum*. *Fisheries Science* **78**: 367-373 (2012). 査読有  
DOI: 10.1007/s12562-011-0465-1

Emilia Noor Sharifah and Mitsuru Eguchi.

The phytoplankton *Nannochloropsis oculata* enhances the ability of Roseobacter clade bacteria to inhibit the growth of fish pathogen *Vibrio anguillarum*. *PLoS ONE*, **6**(10):1-8(2011). 査読有  
DOI: 10.1371/journal.pone.0026756

Akito Taniguchi, Emilia Noor Sharifah, and Mitsuru Eguchi.

Possible role of microalga *Nannochloropsis* in controlling *Vibrio* species in fish larva rearing water. *Aquaculture Science*, **59**: 451-458 (2011). 査読有

[学会発表](計10件)

Emilia Noor Sharifah and Mitsuru Eguchi. Roseobacter clade and *Vibrio* group bacterial diversity and abundances in rotifer culture fed with different types microalgae. 平成25年度日本水産学会春季大会、2013年3月27日、東京。

Emilia Noor Sharifah and Mitsuru Eguchi. The existence of *Roseobacter* clade bacteria in concert with phytoplankton *Nannochloropsis oculata* enhances the inhibition effect against fish pathogen *Vibrio anguillarum*. 第14回国際微生物生態学会(isme14)、コペンハーゲン(デンマーク)、2012年8月20日。

Emilia Noor Sharifah, Akito Taniguchi and Mitsuru Eguchi. Combination of *Roseobacter* clade affiliated bacteria and phytoplankton promised greater inhibition in fish pathogenic bacteria. 第13回国際微生物生態学会(isme13)、シアトル(米国)、2010年8月26日。

谷口亮人, Emilia Noor Sharifah, 江口 充. Microalgae *Nannochloropsis* controls *Vibrio* species growth in a rearing water microcosm. 第13回国際微生物生態学会(isme13)、シアトル(米国)、2010年8月26日。

他6件

[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)

近畿大学農学部水産学科・教授

研究者番号: 40176764

(2) 研究分担者

谷口 亮人 (TANIGUCHI Akito)

近畿大学農学部水産学科・助教

研究者番号: 10548837

家戸 敬太郎 (KATO Keitaro)

近畿大学水産研究所・准教授

研究者番号: 90330240