

海洋細菌EKZ-2 株におけるヒラメ種苗の生残向上効果

野口浩介^{*a}, 前田昌調^{*}

Improvement of the survival rate of flatfish larvae with a marine bacterium, EKZ-2 strain.

Kohsuke NOGUCHI^a, and Masachika MAEDA^{*}

Abstract : This research has aimed for establishing the stable production of flat fish larvae in aquaculture, adopting a marine bacterium, EKZ-2 strain, isolated from the macro algae *Ecklonia kurome* zoospore, that mainly has the pathogen-static activities. When EKZ-2 strain was fed to flat fish juvenile, the increased body weight was observed. And also *in situ* the survival rates of flat fish larvae was improved using EKZ-2 strain in the aquaculture facility of mass production, where the larval mortality had been high because of the pathogenic *Vibrio* infection.

Keywords : aquaculture, biocontrol, antagonism, microorganisms, flat fish

1. はじめに

近年、養殖魚類の疾病防除にはさまざまな方法が用いられている。すなわち、病原菌に未感染の親魚の選定、薬浴による親魚や卵の殺菌、飼育水の殺菌、飼育水の連続的な交換、薬剤投与などの方法が一般的に採用されている。この中で、飼育水の滅菌では、微細フィルターによる濾過とともに、紫外線やオゾンによる処理、さらに塩素剤、抗生物質などの薬剤が使用されているが、これらの手法による、養殖水中の細菌数の減少は一時的な現象にすぎない。例えば抗生物質を飼育水に添加した場合では、薬剤の量と種類によって異なるものの、細菌数が減少・低濃度に維持された後に、耐性菌等の増加により、総細菌数は数10時間でもとの濃度までに回復する (MAEDA, 1999)。また、濾過及びオゾンや紫外線殺菌処理においても、餌

飼料の添加などによって新たな微生物が加入するとともに、水槽壁などの付着微生物が水中に供給されるため、結局は処理前とほぼ同数の微生物が養殖水中に生息することになる。このように、これらの処理で飼育環境から微生物を取り除くことはむずかしく、逆に殺菌処理の後では、細菌群集間の拮抗作用が減少するため、特定の細菌が急速に増加することも考えられる。実際に大半の養殖場がこのような殺菌処理を行っているにもかかわらず、養殖魚の疾病発生は止まらず、かえって被害の規模が拡大していることから、このような処理の効果の低いことが推察できる。そして、国内外の養殖現場では、代替えとなる疾病防除方法の少ない状況において、しばしば人間への害となる核酸染色剤、ホルマリン、銅イオンなどが使用されており、これらの薬剤などの使用は、消費者の養殖魚への不信任増大の一因となっている。

筆者等は、薬剤の使用を低減する目的で、ウナギ、ヒラメ養殖に被害をおよぼすビブリオ病及びエドワジエラ病の原因菌に対して、拮抗能を保持する海洋細菌EKZ-2 株を分離し、ウナギ養殖現場での投与試験を行い、良好な結果を得た (野口・前田, 2006)。こうした背景において、稚魚期における細菌性腸管白濁症 (原因菌, *Vibrio* 属の細菌) が頻発し、薬浴や薬剤経口投与を行っても、ほとんど効果の認められない種苗生産現場におい

^{*} 宮崎大学農学部水産増殖学講座 Tel : 0985-58-7221
Fax : 0985-58-7221 E-mail: gcmaeda@cc.miyazaki-u.ac.jp

Laboratory of Aquaculture, Faculty of Agriculture, University of Miyazaki, Gakuen-kibanadai, Miyazaki 889-2192, Japan

^a 現所属: 佐賀県玄海水産振興センター (Saga Prefectural Genkai Fisheries Research and Development Center, Karatsu, Saga 847-0401, Japan)

て、種苗の安定生産方法を構築するため、上記ウナギ飼育で成果のあったEKZ-2株の投与を行った。本稿では、この種苗生産現場における、EKZ-2株投与下での種苗の生残および飼育水中の投与細菌の消長について報告する。

2. 材料及び方法

2.1 細菌の抗菌活性

使用した海洋細菌EKZ-2株は、大型海藻クロメ (*Ecklonia kurome*) の遊走子培養液中から採取した。そして、MAEDA and NOGAMI (1989)の方法に基づいて単分離した細菌の抗菌活性を検定した。すなわちZoBell 2216E平板寒天培地 (ZOBELL, 1943) 上で分離菌を平行になるように2本塗抹 (縦の長さ4 cm, 間隔3 cm) した後、同一寒天培地上にビブリオ病の原因菌である *Vibrio anguillarum* (American Type Culture Collection 19264) を、供試細菌の間に、長さ2 cmになるように塗抹した。同時に対照区として *V. anguillarum*のみを塗抹した平板培地を設定した。これらの培地について、10日間、22°Cで培養した後、実験区及び対照区における *V. anguillarum*の増殖を比較し、供試菌の抗菌活性を検定した。また、エドワジエラ症原因菌である *Edwardsiella tarda* (ヒラメ由来FPC498 (独) 水産総合研究センター養殖研究所病害防除部所有) に対する抗菌活性検定についても、同様の方法によって行った。なお、この抗菌活性検定は3回行い、その平均値で表した。供試菌の病原菌増殖抑制能は、対照区 (W) と試験区 (w) とにおける病原菌の塗抹菌体の横幅について、 $(1-w/W) \times 100$ としてあらわした。

2.2 ヒラメ稚魚に対するEKZ-2株の増体重効果

上記の抗菌性試験において、高い抗菌能を示したEKZ-2株を3日間、22°Cで液体培養し、ヒラメ用配合飼料S-1に混合して、細菌混合飼料を作製した。すなわち、約 10^9 CFU/ml濃度のEKZ-2株を滅菌生理食塩水で4倍に希釈して200mlとし、この菌液に1 Kgの配合飼料を浸漬、よく混合し、細菌混合飼料とした。次に、約2.5g/尾のヒラメに、この細菌混合飼料を毎日投与する実験区 (10尾飼育) と、配合飼料投与のみの対照区 (10尾飼育) とを各々2水槽設定し、20日間飼育した後、斃死数、成長率等を比較した。なお、給餌量は魚体重の約5%とした。また、実験区と対照区とにおけるデータの有意差は、t検定を用いてあらわした。

Table 1. *Vibrio-static and Edwardsiella-static activities of the strain EKZ-2*

Bacterial strain	<i>Vibrio</i> * -static activity	<i>Edwardsiella</i> * -static activity
EKZ-2	56**	26**

* : *Vibrio anguillarum* and *Edwardsiella tarda* were used as a pathogenic strain.

** : Average of 3 trials

2.3 ヒラメ種苗生産におけるEKZ-2株投与実験

ヒラメ種苗の大量生産施設において、孵化直後から30日間にわたり、種苗生産水 (ヒラメ稚魚約50万尾を飼育) へのEKZ-2株の投与試験を行った。投与期間中の餌飼料としては、孵化後から約10日間はワムシを、その後は配合飼料を用いた。EKZ-2株は、3日間22°Cで培養し、最終濃度約 10^6 CFU/mlになるように養殖水中に毎日投与した (実験区)。そして、菌株を投与しない対照区も設定して、両者におけるヒラメ種苗の斃死数を比較した。また、養殖水を、3日毎の朝8:00、EKZ-2株投与前に採取し、上記のZoBell 2216E培地を用いて、生菌数及びEKZ-2株の出現数を調べた。なお、上記の本試験 (30日間実施) の前に、同施設において12日間の予備試験を行い、EKZ-2株投与下での種苗の成長の是非を確認した。

計数培地上のEKZ-2株のコロニー数の計測については、以下のように行った。EKZ-2株は、周縁部分がやや透明な波状の、そして中心部分がやや濃い白色の特徴あるコロニー形状を示す。そこで、EKZ-2株の純培養株と、EKZ-2株を投与したヒラメ種苗生産水から分離した、当該株とみられるコロニー両者について、García-Martínez *et al.* (1999)において設計された、mac1-1300 Fと23S1Rのプライマーを採用し、PCRによる遺伝子増幅を行った。その結果、両者とも341bp付近にバンドが認められた。このように、計数培地上の特徴あるコロニーがEKZ-2株であると確認されたため、以降は、コロニーによる簡易的な判別を行い、EKZ-2株を計数した。

3. 結果

3.1 抗 *Vibrio anguillarum* 試験及び抗 *Edwardsiella tarda* 試験

EKZ-2株は抗 *Vibrio*試験において強い抗菌活性を示し、また、*Edwardsiella tarda*についても、その増殖を抑制した (Table 1)。両者の比較においてEKZ-2株は、*E. tarda*よりは *V. anguillarum*に対して強い抗菌能を示した。

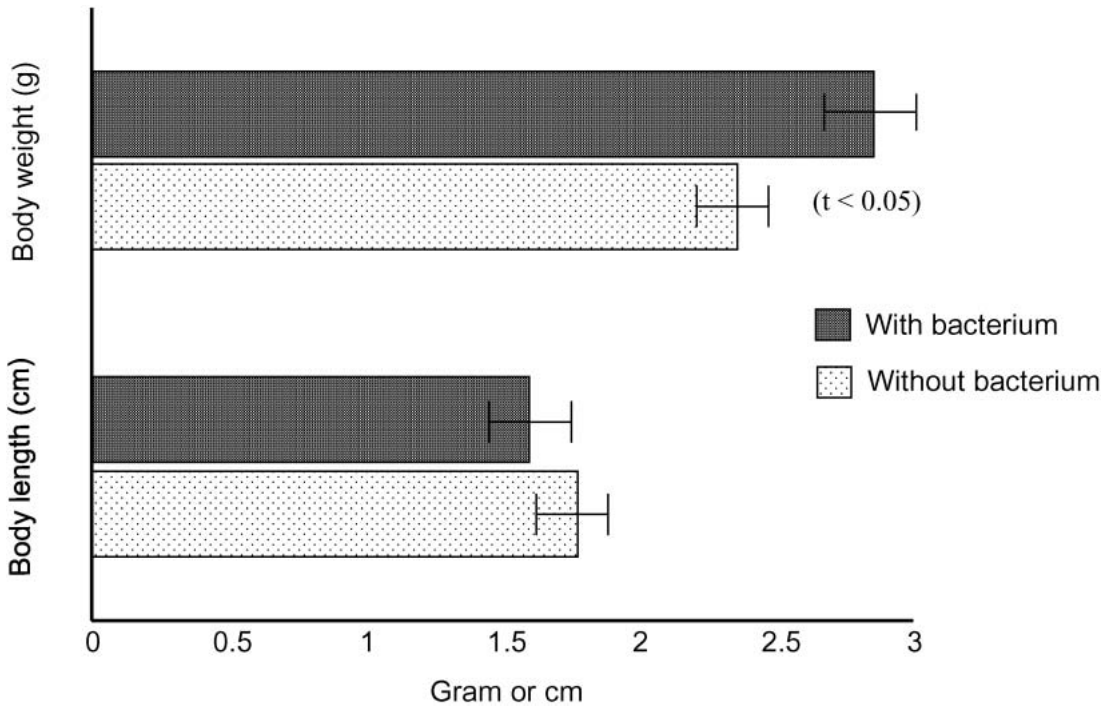


Fig. 1. Comparison of the length and weight of the flat fish juvenile reared with and without the bacterial strain EKZ-2.

3.2 ヒラメ稚魚に対する投与細菌の増体重効果

実験区 (EKZ-2 株投与), 対照区 (EKZ-2 株無投与) とともに, ヒラメの斃死個体は見られなかった。そして, 両実験区において, ヒラメ魚体長の増加には有意な差はなかったが, 増体重では, EKZ-2 株を投与した実験区においてより高い値となった ($t < 0.05$) (Fig. 1)。

3.3 ヒラメ種苗生産におけるEKZ-2 株投与実験

30日間の本試験に先立ち, ヒラメ種苗に12日間EKZ-2 株を投与する予備試験を行い, ヒラメ種苗の良好な生育を確認した (Fig. 2)。次に30日間のEKZ-2 株の投与実験を行ったところ, 実験区では約45万尾中41万尾が生残したのに対して, 細菌無投与区では約40万尾の中で31万尾が斃死する結果となった ($t < 0.01$) (Fig 3)。また, 15日以後の死亡個体の多くに細菌性腸管白濁症がみられた。ヒラメ飼育水中の細菌相については, EKZ-2 株を投与した実験区では恒常的に同株が分離された (Fig 4)。

4. 考 察

水産養殖環境中における病原菌と抗病原細菌との間の拮抗作用は, 自然界では恒常的にみられる

事象であり, この拮抗作用を利用した病原菌防除方法は生物 (学的) 防除またはバイオコントロールと呼ばれる。水産養殖分野の生物防除研究においては, 魚の成長促進効果と同時に病原菌の増殖を抑制する有用な機能を保持した微生物が報告されて以来 (MAEDA & NOGAMI, 1989), 現在までに同じような微生物の探索と水産養殖への実用化例が100編以上の論文で報告されている (MAEDA, 2004, 総説)。このような研究の進展の背景には, 過剰な薬剤使用に対する消費者の危惧感とともに, 薬剤の効力が低減し, 疾病防除が難しくなっている現状がある。

なお, 上記の, 既報の拮抗微生物の多くは, *Vibrio* 属の病原菌を対象としており, *E. tarda* に対して拮抗作用を保持する菌株については, 野口・前田 (2005) の報告が最初である。さらに, ヒラメの大量種苗生産への (*E. tarda* を抑制する) 拮抗細菌の使用については, 本報告が最初となる。

また, 使用したEKZ-2 株の病原菌抑制能は, *Edwardsiella tarda* に対するよりも, *Vibrio anguillarum* に対して強かった。このことは, 病原菌種の相違によって, 拮抗細菌の病原菌抑制機能の発現が異なることを示唆している。

ヒラメ種苗生産の細菌 (EKZ-2 株) 投与区と

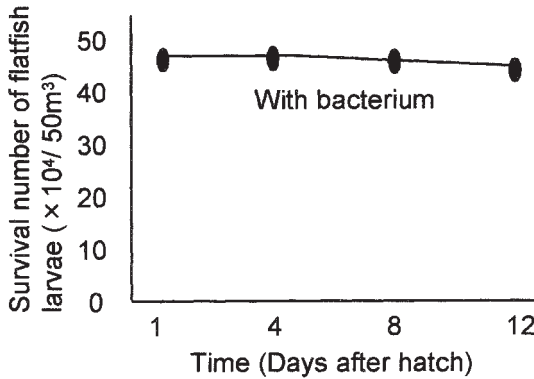


Fig. 2. Survival number of the flat fish larvae, *Palalichthys olivaceus*, with the bacterial strain EKZ-2.

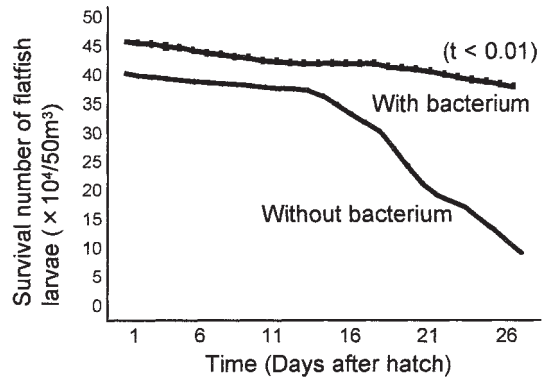


Fig. 3. Survival number of the larvae in the mass production facility of flat fish, *Palalichthys olivaceus*, with and without the bacterial strain EKZ-2.

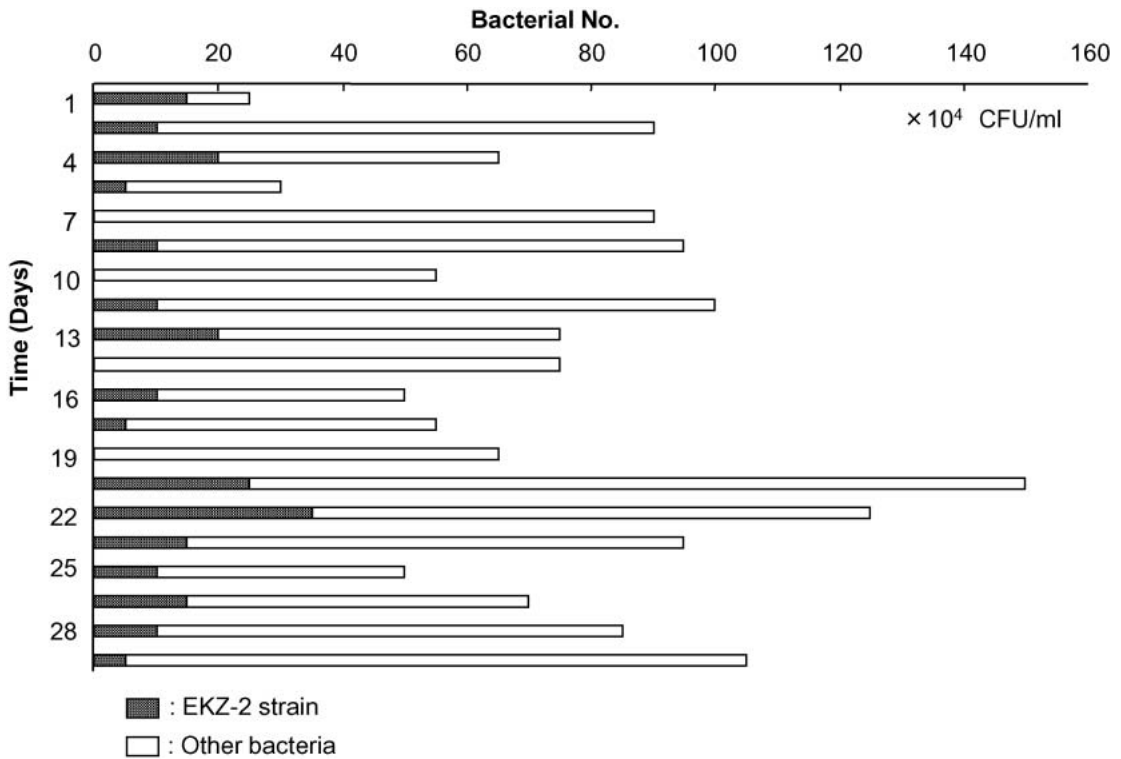


Fig. 4. Number of total bacteria and EKZ-2 in rearing water of the mass production of flat fish larvae.

細菌無投与区において、種苗生残数に有意な差が見られたことにより、EKZ-2株の投与効果が示唆された。そして、養殖水中細菌相において、細菌投与区ではEKZ-2株が高い頻度で分離され、さらに、同区において細菌性腸管白濁症の個体が見られなかったことから、この効果の一因として、

EKZ-2株の有効な拮抗作用が考えられた。また、投与細菌によるヒラメの代謝増進 (MAEDA, 2004, 総説) や環境向上 (MAEDA, 1999) 等も、この効果の一要因として考えられる。

本研究において、病原菌の増殖を抑制する拮抗細菌の有用性が示唆されたが、一般に、有用細菌

をふくむ細菌群は、薬剤や銅イオンなどの殺菌過程で殺滅される可能性がある。特に、抗生物質は、薬剤耐性菌及びウイルスに対する効果は小さいが、有用細菌の増殖は抑制する（野口・前田、未発表データ）。従って、抗生物質投与により、微生物間の平衡が崩れ、病原菌やウイルスがより増殖することが考えられ、このようなプロセスが養殖魚の疾病の拡大の原因の一つといえる。

謝辞

クロレラ工業（株）の方々には、EKZ-2株の大量培養で、また、MBC開発株式会社（鹿児島県、霧島市）の方々には、ヒラメ種苗生産でご協力を頂いたので、ここに謝意を表します。

参考文献

- GARCIA-MARTINEZ, J., S. G. ACINAS, A. I. ANTON, and F. RODRIGUEZ-VALERA (1999): Use of the 16S-23S ribosomal genes spacer region in studies of prokaryotic diversity. *J. Microbiol. Methods*, **36**, 55-64.
- MAEDA, M. (1999): *Microbial Processes in Aquaculture*. Biocreate Press, UK. 102pp.
- MAEDA, M. (2004): Interactions of microorganisms and their use as biocontrol agents in aquaculture. *La Mer*, **42**, 1-19.
- MAEDA, M. and K. NOGAMI (1989) : Some aspects of the biocontrolling method in aquaculture. pp. 395-398. In: *Current Topics in Biotechnology*. (Miyachi, S., *et al.*, Eds.). Japan. Soc. Mar. Biotechnol, Tokyo.
- 野口浩介・前田昌調 (2006) : ウナギ病原菌の増殖を抑制する拮抗細菌. *La Mer*, **44**, 157-160.
- ZOBELL, C. E. (1943): The effect of solid surfaces upon bacterial activity. *J. Bacteriol*, **46**, 39-56.

受付 2009年9月1日

受理 2009年10月21日