HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	細菌叢を制御したシオミズツボワムシを投与したヒラメの腸内細菌叢
Author(s)	清水, 智子; 篠崎, 大祐; 笠井, 久会 他
Citation	水産増殖, 53(3), 275-278
Issue Date	2005-09
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/38526
Rights	© 2005 日本水産増殖学会
Type	journal article
File Information	yoshimizu-223.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

水産増殖（*Aquaculture Science*） 53(3), 275－278 (2005)

細菌叢を制御したシオミズツボワムシを投与したヒラメの腸内細菌叢

清水智子[1]・篠崎大祐[1]・笠井久会[1]・澤辺智雄[1]
渡辺研一[2]・吉水　守[1,*]

Effect of Manipulation of Dietary Rotifer Bacterial Flora on the Intestinal Bacterial Flora of Japanese Flounder

Tomoko SHIMIZU[1], Daisuke SHINOZAKI[1], Hisae KASAI[1], Tomoo SAWABE[1], Kenichi WATANABE[2] and Mamoru YOSHIMIZU[1,*]

Abstract: Effect of manipulation of dietary rotifer *Brachionus plicatilis* bacterial flora on the intestinal bacterial flora of Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* larvae was investigated. Manipulation was done by disinfecting rotifer eggs to reduce viable bacterial counts and then by inoculating hatched rotifers with non-sucrose fermenting *Vibrio splendidus* strain V-15 to make the bacterium dominant in the rotifers. Flounder larvae were fed the manipulated rotifers and intestinal bacterial flora of the fish was monitored. The dominant intestinal bacterial flora of the flounder became *Vibrio* spp. These results indicate that intestinal bacterial flora of flounder can be artificially controlled by manipulating bacterial flora in diets.

Key words: Japanese flounder; *Paralichthys olivaceus*; Roifer; *Brachionus plicatilis*; Bacterial flora; Intestinal flora

魚介類の増養殖事業の進展に伴い，疾病，特にウイルス病の被害が大きな問題となっている（吉水・笠井 2005)。魚類のウイルス病ワクチンが開発され，実用段階に達してきたが，稚仔魚が免疫応答を示すまでの期間あるいはワクチン投与が可能なサイズに達するまでは，従来通りのウイルス病対策に頼らざるを得ない（吉水・笠井 2005)。

ヒラメ *Paralichthys olivaceus* は稚仔魚期に大量死を伴う疾病に感染することが多い（西岡ら 1997)。ウイルス性表皮増生症は，1985 年頃から各地の種苗生産場で孵化後 8～20 日後のヒラメ仔魚に発生し，高い死亡率をもたらすため，防除対策の確立が望まれている。本病の原因ウイルスは未だ分離されていないが，その形態および物理化学的性状からヘルペスウイルスに分類されている（Iida et al. 1989)。

本疾病の防除対策の一つとして，ヒラメ腸管内に存在する抗ヘルペスウイルス活性を有する細菌を餌料生物に添加し，ヒラメ腸管内に定着させ，効率的に抗ウイルス物質を産生させることができれば，本病の発症も抑制できると考える。そこで，本研究ではまず，マツカワ腸管内容物由来の抗ウイルス活性を有する *Vibrio splendidus* V-15株を用いて，ワムシの細菌叢が制御可能かどうかを検討し，次いで *V. splendidus* 優勢ワムシを給餌したヒラメの腸内細菌叢の変化を調べた。

材料および方法

供試菌株

供試菌株は，マツカワの腸管内容物から分離した

2005年 6 月14日受付：2005年 7 月13日受理.
[1]北海道大学大学院水産科学院・水産科学研究院（Graduate School of Fisheries Sciences, Hokkaido University, Hakodate, Hokkaido 041-8611, Japan).
[2]独立行政法人水産総合研究センター古満目栽培漁業センター（Komame Station, National Center for Stock Enhancement, FRA, Komame, Kochi 788-0315, Japan).
*Corresponding author, E-mail: yosimizu@fish.hokudai.ac.jp

Vibrio splendidus V-15株を用いた。*V. splendidus* V-15株は *Oncorhynchus masou* virus (OMV), yellowtail ascites virus (YTAV) および nervous necrosis virus (NNV) に抗ウイルス活性を示し、ショ糖非分解菌である（吉水・絵面 1999)。*V. splendidus* V-15株を液体海水培地（ポリペプトン 5 g, 酵母エキス 1 g, プロテオースペプトン 1 g, 肉エキス 1 g, 寒天15 g, 75% Herbst 人工海水 1 *l*, pH 7.8）で20℃で2日間振とう培養（105回転/min）し、使用時まで4℃で保存した。

供試飼育用餌料

80%海水が入った5 *l* 容量のふ化水槽を準備し、菌添加区には10^6 CFU/*ml* となるように *V. splendidus* V-15株を添加した。ワムシ複相単性生殖卵（以下ワムシ卵）の消毒は 1,250 mg/*l* に希釈したグルタールアルデヒド（水産用グルタラール, 三鷹製薬）に30分間浸漬し、亜硫酸ナトリウムで中和後、ふ化水槽に移した（渡辺ら 2005)。その後、スーパー生クロレラV-12（クロレラ工業）を二次強化剤として添加し、19～26時間、19.8～25℃で培養・孵化させた。対照区には未消毒ワムシ卵を用いた。ワムシへのクロレラ給餌は朝・昼・夕に行い、給餌量はふ化水槽中のクロレラ密度を約2000万 cells/*ml* となるように添加した。また、孵化ワムシを強化する際に上述の 細菌培養液を3,500 × *g* で15分間遠心分離し上清を捨て、滅菌海水で懸濁した後に最終添加濃度が 10^6 CFU/*ml* となるようにワムシ培養槽に添加した。対照には供試菌を加えないワムシを用いた。

ヒラメの飼育試験

ヒラメの飼育試験は、孵化直後のヒラメ1,000尾を100 *l* パンライト水槽に収容し、水温16.2～19.8℃, pH 7.8～8.6, 換水率約200% /日の飼育水で14日間行った。試験区として、ワムシ卵を消毒し、孵化後に *V. splendidus* V-15株を添加してヒラメに給餌した区（菌添加区)、消毒したワムシ卵を孵化させた後、菌を添加せずに給餌した区（消毒区）および対照区として未消毒のワムシ卵を孵化させた後に菌を添加せずに給餌した区（対照区）の3つの区を設けた。各試験区とも水槽を2個設けて計14日間試験を行った。

試料採取および生菌数・細菌叢の測定

試料採取法および生菌数の測定は以下のようにして行った。消毒前後のワムシ卵および各区の孵化ワムシは、試料を秤量後に 9 倍量の Herbst 人工海水（中村 1962）を加えてホモジナイズし、10倍希釈列を作製した。各試料の希釈液0.1 *ml* を SA 培地（Yamamoto et al. 1982）平板に塗抹し、25℃で5日間好気的に培養後、生菌数を測定した。また、それぞれ最適希釈平板上のコロニーを無作為に30個釣菌して純粋分離を行い、絵面・清水 (1990) の方法により、属レベルの分類を行った。給餌試験終了時には、各区のヒラメを茶こしに採取し、Muroga et al. (1987) の方法に従い0.1%塩化ベンザルコニウム水溶液（日本製薬）に1分間浸漬した。その後、水道水で30秒間洗浄し、SA 培地および V-1 培地（小林ら 1994）で生菌数を測定するとともに、前述のワムシと同様に純粋分離を行い、細菌叢を調べた。

結　果

V. splendidus V-15株添加試験前後のワムシの生菌数と細菌叢の変化

ワムシ卵の生菌数は2.1×10^8 CFU/g から消毒により3.5×10^3 CFU/g に減少した。無処理区、消毒区および *V. splendidus* V-15株添加区の孵化ワムシの生菌数は、それぞれ7.3×10^8 CFU/g, 8.2×10^3 CFU/g, 1.6×10^7 CFU/g であった (Table 1)。また、消毒前後のワムシ卵および未処理区の孵化ワムシの細菌叢は、*Flavobacterium* 属が主体を成していた。一方、消毒区の孵化ワムシの細菌叢は *Achromobacter* や *Alteromonas* が主体を成しており、*V. splendidus* V-15株添加区のワムシでは *Vibrio* 属が主体を成していた (Fig. 1)。

V. splendidus V-15株添加ワムシを給餌したヒラメ腸管内細菌叢の変化

V. splendidus V-15株添加ワムシを給餌したヒラメの腸管内細菌叢および生菌数を Table 2 に示した。給餌試験14日後の未処理区、消毒区および *V. splendidus* V-15 株添加区ヒラメの生菌数は、SA 培地でそれぞれ 3.4×10^6 CFU/g, 5.9×10^1 CFU/g および 3.4×10^6 CFU/gとなった。V-1 培地では、それぞれ 5.3×10^6 CFU/g, 1.8×10^3 CFU/g および 1.4×10^5 CFU/g となり、そのうちショ糖非分解菌の割合は62%, 59%

Table 1. Viable bacterial counts of rotifer eggs and hatched rotifers

Group	Viable bacterial counts (CFU/g)
Rotifer eggs before disinfection	2.1×10^8
Rotifer eggs after disinfection	3.5×10^3
Hatched rotifers from eggs not disinfected	7.3×10^8
Hatched rotifers from disinfected eggs	8.2×10^3
Hatched rotifers inoculated with *V. splendidus* strain V-15	1.6×10^7

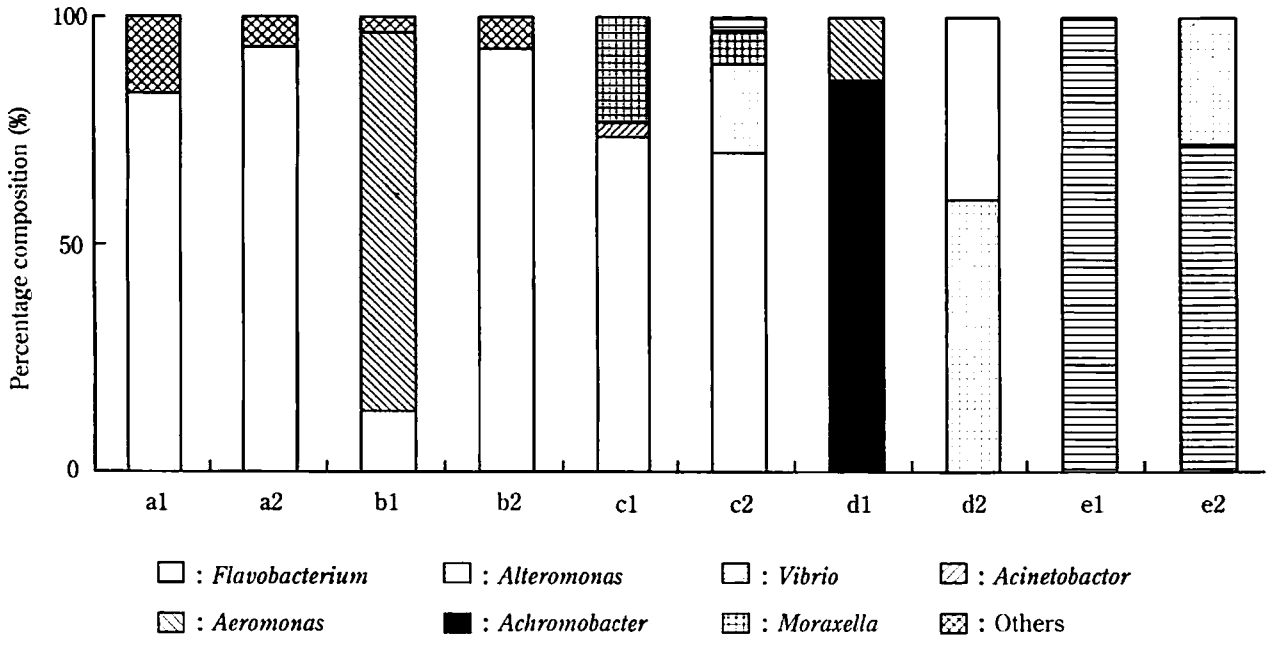

Fig. 1. Bacterial population composition in rotifer eggs and hatched rotifers. a1, a2: Rotifer eggs before disinfection. b1, b2: Rotifer eggs after disinfection. c1, c2: Hatched rotifers from eggs not disinfected. d1, d2: Hatched rotifers from disinfected eggs. e1, e2: Hatched rotifers inoculated with *V. splendidus* strain V-15.

Table 2. Changes in viable bacterial counts of non-sucrose fermenting *Vibrio* spp. in the intestine of Japanese flounder fed *V. splendidus* strain V-15 rich rotifers

Group	Viable bacterial counts on two media(CFU/g)		Percentage of non-sucrose fermenting *Vibrio* spp. in Japanese flounder*1 (%)
	SA	V-1	
a*2	3.4×10^6	5.3×10^6	62
b*3	5.9×10^4	1.8×10^3	59
c*4	3.4×10^6	1.4×10^5	100

*1 Tested by V-1 medium.
*2 Japanese flounder fed non-treated-rotifers.
*3 Japanese flounder fed rotifers hatched from disinfected eggs, but not inoculated with *V. splendidus* strain V-15.
*4 Japanese flounder fed rotifers hatched from disinfected eggs, and inoculated with *V. splendidus* strain V-15.

および100%であった。なお，本菌を給餌したヒラメは通常飼育群と成長に差はなく，さらに過剰に与えても腹部膨満症になることもなかった。

考　察

抗ウイルス活性を有する細菌の有効利用の一つとして，サケ・マス類あるいはマツカワから分離した抗ウイルス活性を有する細菌を経口投与することによるウイルス病の生物制御が試みられ，成果を上げている（Yoshimizu et al. 1992; 吉水・絵面 1999)。近年，ワムシ卵の消毒が可能になったことから（渡辺ら 2005)，同様の手法を用いることにより，アルテミアより前のステージに給餌するワムシを用いて，魚類ウイルス病の生物学的制御が可能になるのではないかと考えられる。

そこでまず，ワムシの細菌叢を検討したところ，消毒前のワムシ卵および未処理区の孵化ワムシの細菌叢は，共に *Flavobacterium* 属が主体を成していたことから，ワムシの菌叢は孵化前後で変わらないことが示された。一方，高密度培養したワムシの細菌叢は *Pseudomonas* 属や *Vibrio* 属が主体を成すと考えられている（Muroga et al. 1987; 宮川・室賀 1988; 山野井 1990)。今回供試した粗放連続培養したワムシの細菌叢は *Flavobacterium* 属が優勢であった。このことは，通常行われている高密度連続培養システム下のワムシの細菌叢は *Pseudomonas* 属や *Vibrio* 属細菌が優勢となり，一度優勢となるとそのまま継続されているものと考える。高密度培養時に優勢になる *Vibrio* 属細菌の種によっては，時に腹部膨満症が発生しているが，今回供試した *V. splendidus* V-15株では腹部膨満症は発生しなかったことから，菌種の選択により本症の防除

が可能と考える。

次いで、*V. splendidus* V-15株を添加したワムシをヒラメに給餌し、ヒラメ腸管内に本菌が定着するかどうかを検討した。今回はショ糖分解能のない *V. splendidus* V-15株を選び、ワムシに添加して給餌した。ヒラメ腸管内における *Vibrio* 属細菌のうち、ショ糖非分解菌の割合は未処理区で62%、消毒区で59%、菌添加区で100%となり、通常、海産魚の腸管内に存在する *Vibrio* 属細菌はショ糖分解性を有するものが多いことから、ヒラメ腸管内には添加細菌がある程度定着したと考えられる。今後は、ヒラメ腸管内から抗ヘルペスウイルス活性を有する細菌を分離し、ヒラメへの経口投与試験を行い、ヒラメおよび飼育水における抗ヘルペスウイルス活性の賦与について検討したいと考える。同時に腹部膨満症を起こさない菌を選抜し用いることで、ウイルス性表皮増生症だけでなく、腹部膨満症の防除にも展開できるものと期待する。

要　約

消毒前のワムシ卵および未処理区の孵化ワムシの細菌叢は、共に *Flavobacterium* 属が主体を成していたことから、孵化前後でワムシの菌叢は変化しないことが示された。また、消毒して孵化させた後に *V. splendidus* V-15株を添加した区のワムシの細菌叢は *Vibrio* 属が主体を成していた。これらの結果から、ワムシの細菌叢は制御可能であることが示唆された。次いで、ショ糖分解能のない抗ウイルス活性を有する *V. splendidus* V-15株優勢ワムシをヒラメに給餌した。ヒラメ腸管内における *Vibrio* 属細菌のうち、ショ糖非分解菌の割合は未処理区で62%、消毒区で59%、菌添加区で100%となり、ヒラメの腸内細菌叢も制御可能であることが示唆された。

謝　辞

本研究材料の採集に際し、種々の便宜を計っていただいた(独)水産総合センター能登島栽培漁業センター元場長の桑田　博氏および小磯雅彦氏をはじめ職員各位に感謝いたします。また、本研究の一部は21世紀COEプログラムのサポートにより実施した。ここに記して感謝を申し上げます。

文　献

Iida, Y., K. Masumura, T. Nakai, M. Sorimachi and H. Matsuda (1989) A viral disease in larvae and juveniles of the Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. *J. Aquat. Anim. Health*, 1, 7-12.

絵面良男・清水　潮 (1990) 水質・微生物編. 日本海洋学会 (編), 沿岸環境調査マニュアルII. 恒星社厚生閣, 東京, pp. 357-372.

小林秀樹・両角徹雄・浅輪珠恵・三宅正仁・三谷賢治・伊東伸宣・反町　稔 (1994) *Vibrio anguillarum* の選択鑑別培地による分離および分子生物学的迅速同定法の確立. 魚病研究, 29, 113-120.

宮川宗記・室賀清邦 (1988) シオミズツボワムシ *Brachionus plicatilis* の細菌叢. 水産増殖, 35, 237-243.

Muroga, K., M. Higashi and H. Keitoku (1987) The isolation of intestinal microflora of farmed red seabream (*Pagrus major*) and black seabream (*Acanthopagrus schlegeli*) at larval and juvenile stages. *Aquaculture*, 65, 79-88.

中村　浩 (1962) 海洋微生物. 微生物ハンドブック, 技報社, 東京, pp. 610-621.

西岡豊弘・古沢　徹・水田洋之介 (1997) 種苗生産過程の海産魚介類における疾病発生状況. 水産増殖, 45, 285-290.

山野井英夫・尾田　正・浮田和夫 (1990) シオミズツボワムシにおける *Vibrio*, *Pseudomonas* および *Moraxella* 分離菌株の実験的動態. 日水誌, 56, 461-466.

Yamamoto, H., Y. Ezura and T. Kimura (1982) Effects of antibacterial action of sea water on the viability of some bacterial species. *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.*, 48, 1427-1431.

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, Japan, pp. 301-307.

吉水　守・絵面良男 (1999) 抗ウイルス物質産生細菌による魚類ウイルス病の制御. *Microbes Environ.*, 14, 269-275.

吉水　守・笠井久会 (2005) 魚類ウイルス病の最前線　その現状と防除対策. 化学と生物, 43, 48-57.

渡辺研一・篠崎大祐・小磯雅彦・桑田　博・吉水　守 (2005) シオミズツボワムシ複相単性生殖卵の消毒. 日水誌, 71, 294-298.