



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	ホタルの光で養殖の水環境をチェック!!
Author(s)	吉仲, 桃子; 村重, 朋浩; 本間, 直幸 他
Citation	養殖, 42(1), 81-83
Issue Date	2005-01
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/48580
Type	journal article
File Information	yoshoku_sawabe.pdf



ホタルの光で 養殖の水環境をチエツク!!

「養殖魚の健康状態の確認、毎日、ご苦労さまです。今日は、えさ食いの悪い魚はいませんか？」あの水槽は、昨日と様子が違ったなあと思ひ当たることはありませんでしたか？」

養殖魚の健康状態がいつもと違った時、今までの経験から多くの情報やデータを引き出して、その原因究明を行うことと思ひます。水槽に送られる水の状態は？ 空気の量は？ えさの量は？ 水温は？ 天気は？ 昨日と変わったことは？ 去年との違いは？ 病気？？？ まさか…。

「飼育条件で考えられることはすべて正常だけでも、ある特定の水槽で養殖魚の健康状態が悪く、死亡する場合もある」という状況では、水産試験場や研究機関に相談し、対策を立てることが有用な対処法の1つです。この対処法は、今後同じように不健康な養殖魚や病気の養殖魚を出さないためにも重要です。しかしこの場合、検査期間中に他

の水槽の養殖魚も死亡する場合や、検査を依頼したものの、検査を開始すると健康状態が悪くなる養殖魚は出なくなる場合などさまざまなケースがあると思ひます。

現在、水槽内あるいは養殖魚中の病原菌の有無を確認するには、病原菌の培養、分離が必要になり、検査日数が必要です。すでに、研究が進んでいる病原菌の場合は、遺伝子診断による判定も可能ですが、ある程度の発症が確認されないと確定診断は難しいのが現状です。もちろん、このような検査は、高価な試薬や機器、施設が必要ですし、誰にでも簡単に結果が出せるといふわけにはいきません。さらに、養殖魚の死亡原因が病原菌ではない場合は、より一層診断が難しくなります。なぜなら、人間の場合も同じですが、体調が悪い（免疫力が低下している）時は、通常は病気を起こさないような細菌が原因で、病気になる場合（日和見感染）があるからです。従って、で

吉仲 桃子¹⁾
村重 朋浩²⁾
本間 直幸¹⁾
澤辺 智雄²⁾

¹⁾プロメガ(株)テクニカルサービス部
²⁾北海道大学大学院水産科学研究科

著者代表：(よしなかつこうこ)
プロメガ(株)テクニカルサービス部。水産学博士。北海道大学大学院在籍中、吉水守教授に師事し、伝染性造血器壊死症ウイルス (IHNV) の迅速診断法の開発に関する研究を行う。2003年10月より現職。

きる限り養殖魚の健康状態が悪くならないように飼育管理することが重要になります。

ATP量の測定

それでは、なぜ、ある特定の水槽で養殖魚の健康状態が悪くなるケースがあるのでしょうか？

飼育水槽ごとに養殖魚の健康状態が違うという現象の理由として、水槽の位置、日当たりの差、水温の差、飼育魚の個体差などが考えられますが、養殖施設ごとの養殖条件の違いもあるため、一概には言えません。しかし、このような飼育水槽ごとの違いは、その水槽の中で暮らす小さな生物（細菌、原生動物、プランクトンなど）に反映されると考えられます。

飼育水は、見た目には透明で同じでも、病原菌の混入や、活発に活動している小さな生物の量には差があるかもしれません。人間も、活発に活動している小さな生物が多い（不

衛生な）環境と少ない（清潔な）環境では、不衛生な環境の方が病気になるリスクが高くなります。そのため、水槽内の活発に活動している小さな生物の量を把握することは、養殖魚の健康を保つのに重要だと考えられます。

しかし、活発に活動している小さな生物、特に細菌の数を測定する生菌数測定法は、寒天培地のプレートを用いて生育したコロニー数を数えるという、日数と手間のかかる作業です。そのため、水槽ごとに生菌数の比較を行うことは、大変な労力を必要とし、定期的に検査することは現実的に不可能です。

今回、紹介しますプロメガ(株)のBacTiter—Glo™ Microbial Cell Viability Assay (以下 BacTiter—Glo™: パクタイター・グロ)による活発に活動している小さな生物由来のATP量の測定は、日数と手間がかかる生菌数測定法に代わる方法となり得ることが確認できました。さらに、短時間（5分程度の測定）で多くのサンプルの結果を出すことが可能ですので、水槽ごとに活発に活動している小さな生物の量をモニターすることができまます。このような水槽ごとの検査や管理は、養殖魚が病気になるリスクを減らし、水槽ごとの違いを把握するのに役立つと考えまます。

実験例の紹介

BacTiter-Glo™ は、ルシフェラーゼ反応（発光反応）の原理を応用し

た製品です。（ルシフェラーゼ反応に関する情報は、本間の稿を参照してください。）
ここでは、ルシフェラーゼ反応に

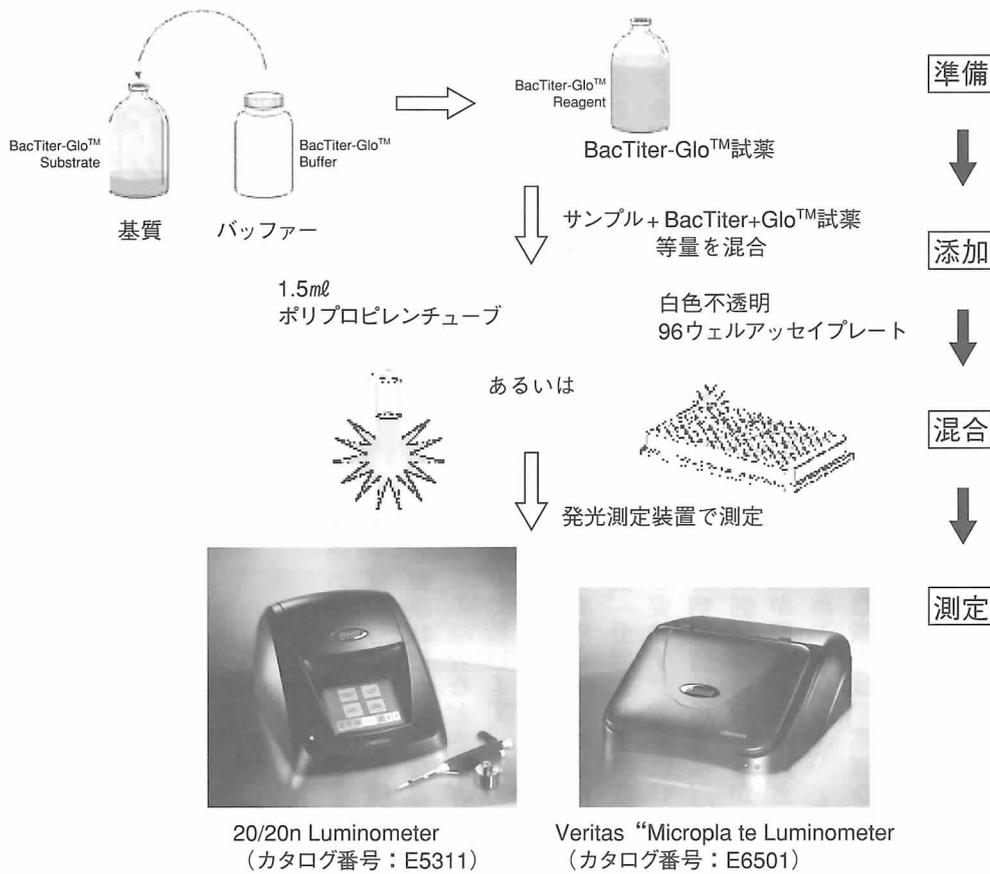


図1 実験操作の流れ

必要な ATP を活発に活動している生物由来の ATP に置き換えることで、その量を見積もります。発光の測定には、ルミノメーター（発光測定装置）を使用します。実験は、図1に示すように添加→混合→測定非常に簡単操作で行うことができます。サンプル数にもよりますが、操作時間はわずか5分程度で測定が完了します。

それでは、BacTiter-Glo™ を養殖場での飼育水に用いた実験結果を紹介いたします。今回の実験を行いました養殖場は2カ所と同じ種類の養殖魚を飼育しています。それぞれの施設での採水場所は図2と図3を参照してください。

施設①では、海水を汲み上げて海水タンクに貯めた後（サンプルA）、砂ろ過機でろ過した海水（サンプルB、C）を飼育水槽に供給しています。1次水槽で使用した飼育水（サンプルD）は、再度、砂ろ過機でろ過され（サンプルE）、2次水槽の飼育水として使用されます。2次水槽で使用した飼育水（サンプルF）は、飼育排水として処理されます。

一方、施設②では、海水を直接、砂ろ過機でろ過し（サンプルG）、飼育水槽に供給しています。飼育水槽で使用した海水（サンプルH）は、飼育排水として処理されます。また、施設②では、同じように飼育水を供

給しているにもかかわらず、えさ食いの悪い養殖魚が多い水槽があったため、その水槽の飼育水も試水としました（サンプルI）。

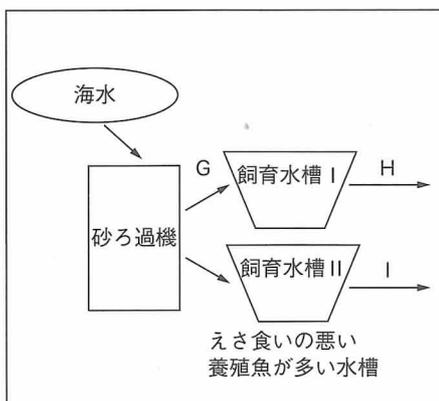


図3 養殖施設② 採水場所の概略図

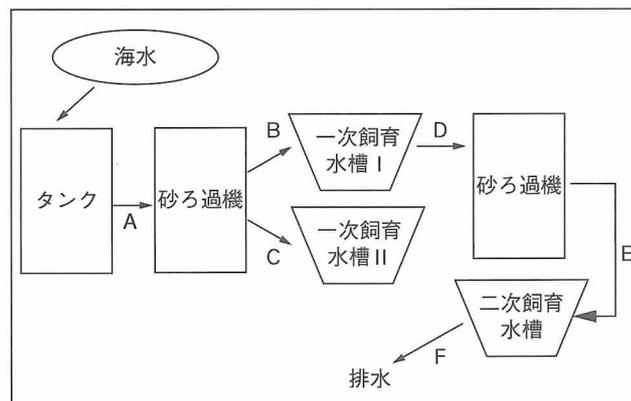


図2 養殖施設① 採水場所の概略図

これら試水について、総菌数、生菌数と BacTiter-Glo™ による ATP 量の測定を行いました(図4)。ここの総菌数は、水槽内のすべての細菌数を示しており、DAPI(ダピール)染色という方法でDNAを染色し、顕微鏡下で染色された細菌数を数えました。生菌数は、希釈した試水を寒天培地に塗って、生育してきた細菌のコロニー数を数えました。

どのサンプルでも総菌数は、ほぼ同程度ですが、生菌数はサンプルによって異なります。特に、砂ろ過を行った後の海水は明らかに生菌数が減少しました(サンプルB、C、E、G)。砂ろ過水を供給した飼育水槽では、生菌数の増加がみられました(サンプルD、F、H、I)。

この一次飼育水を、再度、砂ろ過した2次ろ過水(サンプルE)では、砂ろ過の効果により生菌数が減少しましたが、2次水槽に供給されることにより、生菌数は再び増加しました(サンプルF)。BacTiter-Glo™ で測定した各サンプル中のATP量は、生菌数測定の結果とほぼ同じ推移を示しました。

言い換えれば、時間と手間のかかる生菌数測定を行わなくてもわずか5分程度のATP量測定で、水槽ごとの生菌数の違いを把握することが可能となります。

では、なぜATP量は総菌数ではなく、生菌数と相関関係があるのでしょうか? ATPは、活発に活動している(代謝活性が高い)場合に、多く作られる物質です。簡単に培養ができない細菌(代謝活性が低い)のATP量は非常に低いと考えられます。よって、BacTiter-Glo™ で測定した各サンプル中のATP量は、

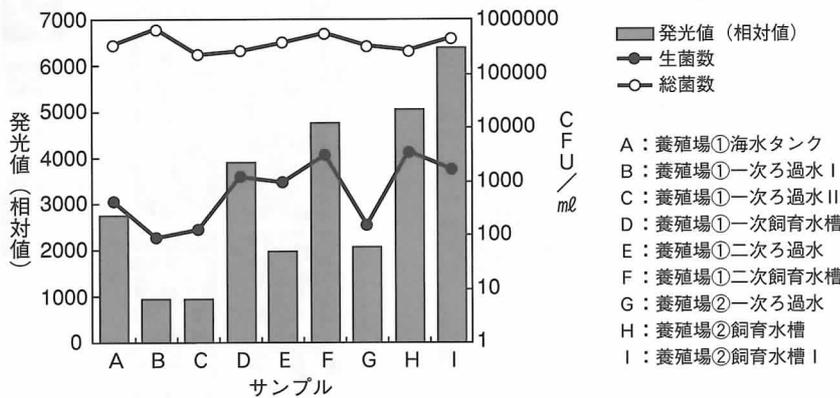


図4 実験結果

簡単に培養ができない細菌数も含む指標である総菌数よりも、代謝活性の高い細菌数の指標である生菌数と、より高い相関性が得られたと考えられます。

今回の実験結果でサンプルIだけが、他の結果と比較して、生菌数とATP量が異なる結果を示しました。その理由については、次のようなことが考えられます。

BacTiter-Glo™ 試薬には、細菌を溶かすための界面活性剤が含まれています。これによって、試水中の細菌を溶かし、含まれるATP量を測定しますが、細菌だけでなくその他の活発に活動している小さな生物も溶解している可能性があります。よって、測定結果のATP量は細菌由来だけとは限りません。サンプルIの水槽では、活発に活動している細菌とともに、残餌や養殖魚の排泄物を栄養とする原生動物やプランクトンも増えている可能性が考えられます。養殖施設②の水槽IIにおいて養殖魚の健康状態が悪くなったのは、これらの活発に活動している小さな生物が、他の水槽よりも多くなってしまうためかもしれません。

BacTiter-Glo™ の利用

今回の実験で、BacTiter-Glo™ を用いたATP量の測定は、生菌数測定に代わる方法となる上に、短時間

で多くのサンプルの結果を出すことが可能であることが分かりました。例えば、96穴プレートを用いますと、同じサンプルを3穴ずつ測定し(信頼できる結果を得るため)、コントロールやバックグラウンドを含めても30サンプル(30の水槽あるいは30カ所の採水場所)程度の同時測定が可能になります。

また、水槽内の環境(活発に活動している生物量)は、飼育水が常に供給されて排水されるといふ水の流れがあるため、1日の温度変化や給餌前後などの影響で刻々と変化していると考えられます。これら時間とともに変化する環境を直ちにモニタリングできることは、養殖場の飼育水の検査や管理において大変画期的なことであり、BacTiter-Glo™ を、養殖施設でも効果的に利用していただきたいと思っております。

なお、BacTiter-Glo™ とルミノメーター(発光測定装置)に関する詳しいお問い合わせは、プロメガ(株)テクニカルサービス部までご連絡ください。

問い合わせ先

〒103-0001

東京都中央区日本橋大伝馬町14-15

マツモトビル1階

TEL 03-3669-7980

FAX 03-3669-7982

e-mail: prometeq@jp.promega.com