

# 養殖環境における生物濾過膜微生物の 制御による病原微生物防除方法の開発

(研究課題番号：14560165)

平成14～15年度科学研究費補助金

基盤研究(C)(1)

研究成果報告書

平成16年3月

者：前田昌調  
(宮崎大学農学部教授)

本研究は、年々規模が拡大する水槽養殖において、生物濾過膜上の微生物を有効利用することにより養殖水中の病原微生物（病原細菌、ウイルス等）を生物的に防除（バイオコントロール）することを目的としている。このために生物濾過膜上において、病原細菌（*Vibrio anguillarum*, *Edwardsiella tarda* 等）や病原性ウイルスの増殖を抑制する有用微生物（拮抗微生物）の出現生態を明らかにするとともに、その利用による魚類の疾病防除についての研究を行った。これらの有用微生物機能の利用によって養殖水中の病原微生物の防除が可能となり、薬剤あるいは滅菌装置の使用頻度、規模の縮小が期待できる。

#### 研究組織

研究代表者：前田 昌調（宮崎大学農学部教授）

研究分担者：吉田 照豊（宮崎大学農学部助教授）

研究分担者：飯田 貴次（独立行政法人水産総合研究センター病害防除部長）\*

(\*平成 14 年度のみ分担)

#### 交付決定額（配分）

（金額単位：千円）

	直接経費	間接経費	合計
平成 14 年度	2,200		2,200
平成 15 年度	1,400		1,400
総計	3,600		3,600

#### 研究発表

##### (2) 口頭発表

野口浩介、長野直樹、鈴木祥広、丸山俊朗、前田昌調：養殖水中のバイオフィルムにおける微生物の変動. 日本水産学会大会（1993 年 4 月 4 日）

野口浩介、小川尚樹、岩田一夫、前田昌調：養殖水の滅菌過程における細菌群の変動. 日本水産学会大会（1994 年 4 月 4 日）

##### (3) 出版物

Maeda, M. (2002): Microbial communities and their use in aquaculture. C-S Lee (Ed.)

In “Microbial approaches to aquatic nutrition within environmentally sound production systems”, World Aquaculture Society, USA., 61-78.

Maeda, M. (2002): Coordination of the international cooperative research in agriculture, forestry

and fisheries fields. Fish. Sci., 60: 1940-1943.

Maeda, M. (2003): Utilization of microbial antagonism for biological control in aquaculture. In: Aquaculture Managemnet, Asian Productivity Organization, Tokyo, 35-73.

前田 昌調 (2004) : 微生物による魚介類疾病防除と成長促進 (I). —プロバイオティクスとバイオコントロール製剤—. 日本水産資源保護協会月報、No. 466、8-11.

前田 昌調 (2004) : 微生物による魚介類疾病防除と成長促進 (II). —バイオコントロール製剤から微生物ラインへ—. 日本水産資源保護協会月報、No. 467 (印刷中).

研究成果による工業所有権の出願・取得状況

工業所有権の名称: 魚類の養殖における病原性微生物の防除および有機物分解のための方法および構造物

発明者名 : 前田昌調、野口浩介

権利者名 : 宮崎 TLO

出願番号 : 特願 2003-382430

出願年月日 : 平成 15 年 11 月 12 日

前田 昌調、吉田 照豊、飯田 貴次

## はじめに

日本では1980年代に入り種苗生産技術が飛躍的に向上し、各種海産魚の集約的養殖が行われるようになったが、種苗生産および養成課程でウイルス病による被害が続発している。これらのウイルス病は致死性が高く、種苗生産事業および養殖業の存続を揺るがしかねないほどの問題となっている。疾病例では、ヒラメの仔魚に特有のウイルス性表皮増生症(VEH)、ブリの稚魚に発生するウイルス性腹水症(YTAV)、イシダイ、シマアジなどの種苗生産対象魚に発生するウイルス性神経壊死症(VNN)などがある。また、甲殻類においてもウイルス病は深刻な問題となっており、台湾においては、突発的かつ広範囲に発生したエビウイルス疾病により、1987年に80,000トン/年以上に達したエビ生産量が翌年(1989年)30,000トン/年に減少、90年には10,000トン/年を下回った。また、日本でもクルマエビ類の急性ウイルス血症(PAV)が深刻な問題となっている。本病は外来性の病気と考えられており、1993年に中国産種苗の導入地域で発生し始め、1994年以後はこれらの種苗を導入していない地域にも発生するほどに急速に拡大し、クルマエビ養殖業に多大な損害を与えている。

微生物間の拮抗作用において、抗ウイルス細菌が養殖環境に存在する場合には、生物から他の生物に感染する能力を持っているウイルスの感染は抑制できる可能性がある。実際、自然海水中においては抗ウイルス作用を持つ細菌が生息し、これらの細菌がウイルスを分解することが分かっている。さらに水産養殖においてもVKM-124菌株、*Pseudoalteromonas undina* は、*Vibrio.spp* 疾病予防とともにSJNNV、バキュロウイルスおよびイリドウイルスの稚魚感染を防除した例がある(Maeda 1999)。

このような背景において1989年に初めて、魚の成長促進効果と同時に病原菌の増殖を抑制、さらに海底土のヘドロなどの有機物を分解する有用な機能を保持した微生物が報告され(Maeda等,1989)、その後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数10編の論文で報告されている。世界でこのような急速な研究の発展の背景には、養殖における過剰な薬剤使用に対する消費者の危惧感の増大と監視体制の強化が挙げられるが、同時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。しかし、これらの微生物の養殖への実用化プロセスはいまだ確立していません、例えば使用する微生物の養殖水中における消長等の知見も少ない。また、水中への有用細菌の定着方法も明らかではなく、抗ウイルス・抗病原性を持つ機能性細菌の保持数も少ないのが現状である。

本研究は、養殖水中に設置した生物濾過膜上の抗ウイルス・抗病原性活性を持つ機能

性細菌を利用して魚介類の疾病を生物的に防除し、なおかつ魚介類の成長を促進するバイオコントロール（生物学的防除）方法の確立を目的としている。このために本研究では養殖水中での細菌群の分布、生物濾過材上の細菌分布の様相、この細菌群集中の抗ウイルス・抗病原性細菌の割合等を明らかにするとともに、有用細菌投与環境で病原菌の攻撃試験を行い、魚類における疾病防除効果を検討した。

### (1) イシガキダイ養殖水のバイオフィームにおける微生物の変動

材料および方法

#### バイオフィームの採取

イシガキダイ *Oplegnathus punctatus* を飼育している循環濾過式水槽において養殖水とバイオフィームを採取した。バイオフィーム形成のためには養殖水中に滅菌済みスライドガラスを浸漬し、5日間通して毎日適当数のスライドガラスを採取し、滅菌海水を満たした100mlビーカーに静置し、直ちに実験室に運んだ。次にスライドガラス上のバイオフィームを、滅菌セルスクレーパーで剥離し、また濾過槽中の生物濾過材上のバイオフィームも滅菌ブラシを用いて滅菌海水中で剥離した。

#### 細菌分離

採取したバイオフィームは試験管中の滅菌海水で十分に攪拌した後、 $10^{-1}$ ~ $10^{-6}$ の希釈段階を順次設定し、希釈水を100 $\mu$ lずつ平板寒天培地(ZeBell 2216E)に接種した。この平板培地は20°Cで1週間培養し、その後コロニー数(生菌数)を計数した。

また、直接計数法を用いた総菌数の計数はPorter & Feig (1980)の直接計数法、いわゆるDAPI (4'6-diamidino-2-phenylindole)染色法を使用した。すなわち試料を2%ホルマリンで固定した後、濾過滅菌したDAPI溶液(1 $\mu$ l/ml)を添加し、暗所で5分間放置し、次に吸引濾過によってヌクレオフィルタ上細菌粒子を捕集した後、フィルタを滅菌蒸留水で数回洗浄した。このフィルタを無蛍光イマージョンオイルを1滴置いたスライドガラスにのせ、カバーガラスで封入し、落射蛍光顕微鏡を用いてUV励起下で細菌を検鏡した。

#### 抗Vibrio試験

Maeda&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。ZoBell 2216E 平板寒天上で分離菌を平行になるように2本塗抹(スミアの長さ4cm、スミア間隔3cm)した後、3日間培養した。次に、寒天培地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2cmのスミア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。これらの菌を移植した培地を10日間培養した後、対照区と比較することにより*V. anguillarum*に対する抗菌活性を検定した。

#### 抗ウイルス試験

伝染性造血器壊死症の原因ウイルスであるIHNウイルスはマスノスケの胚由来細胞CHSE-214を用いて増殖させた。ウイルスが細胞内で増殖すると、細胞の形態が変化し

多くの場合死滅する。このような細胞の変化を細胞変性効果(CPE)という。本実験では、抗菌活性の強い培養細菌株の上澄液がウイルス増殖を抑制するか否かを、CPE プロセスを観察することにより判定した。

MEM 培地の調整はダルベック変法イーグル培地 9.5g/lに蒸留水を加え十分に溶解した後、10%炭酸水素ナトリウムを混合して pH を調節滅菌して行った。さらに濾過滅菌した L-グルタミンを 0.584g/lの濃度で加え、細菌汚染がないかを 30°C下で 3 日間観察した。その後、10%ウシ胎児血清(FBS)と 10,000 units/mlペニシリン、10mg/mlストレプトマイシンと 25  $\mu$ g/ml ファンギゾンを含む抗生物質を 500  $\mu$ l/l加えた。本培地において CHSE-214 細胞は 24 穴プレートを用いてコンフルエントまで成長させた。また同時に供試菌株を ZoBell 2216E 液体培地で 3 日間培養した。次に IHN ウイルス液と供試菌培養上澄液(6000 rpm で遠心分離)を 100  $\mu$ lずつ CHSE-214 と MEM 培地を設定した各プレート中に分注した。対照区として IHN ウイルスのみと供試菌培養上澄液のみの実験区も設定し、それぞれのプレートの CPE を観察した。

#### 分離菌株の簡易性状試験

分離菌株は Okuzumi *et al.*(1981)の簡易同定法に基づき、グラム染色、運動性、形態、色素産生能、チトクロームオキシダーゼ反応、ブドウ糖発酵性の結果より属レベルの同定を行った。

#### 結果

バイオフィームと養殖水中の細菌数:循環濾過式イシガキダイ飼育水槽における水中細菌、付着細菌の日数ごとの経過を図 1、2 に示した。養殖水中の細菌数は平板法、直接検鏡法とも 5 日間においてほぼ一定しており、各々約  $1 \times 10^5$  cells/ml、 $2 \times 10^6$  cells/ml であった。水槽中に浸漬したスライドガラス上において、平板法では 1 日目に  $1 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup>の細菌数が計数され、3~5 日目では菌数の増加は滞り、ほぼ  $1 \times 10^6$  cells/cm<sup>2</sup>レベルの菌数となった。直接検鏡法による総菌数は浸漬 1 日目では  $3.5 \times 10^5$  cells/cm<sup>2</sup>、5 日目では  $3 \times 10^6$  cells/cm<sup>2</sup>となった。

抗 *Vibrio* 試験:イシガキダイ循環濾過式水槽から採取した細菌について平板培地上のコロニーの色素産生・形状からスライドガラスの付着細菌 9 種、養殖水から 6 種、生物濾過材からは 7 種、計 22 の菌株を単分離した。すべての分離株において抗菌活性試験を行った結果、22 株中 13 株は明らかな抗 *Vibrio* 活性を示した。(表 1)

抗ウイルス試験:抗 *Vibrio* 活性を保持する菌株について抗ウイルス試験を行った結果、すべての供試菌株は細胞変性効果(CPE)を抑制した(図 3)。特に細菌株 OP-8、PB-5 と PB-6 は強い抗ウイルス活性を示し、また大半の供試菌株上澄液については CHSE-214 細胞を死滅させる作用は示さなかった。(図 4)

分離菌株性状試験：分離菌株(22株)の中で3株は運動性(+)、チトクロームオキシダーゼ(+)、ブドウ糖無発酵の性状を示したため *Pseudomonas* III/IVに属すると考えられる。また、他の3株は運動性(+)、チトクロームオキシダーゼ(+)、ブドウ糖を好氣的に分解したため *Pseudomonas* I/IIに該当すると思われる。7株は色素産生能(+)、運動性(-)、ブドウ糖無発酵であったため *Flavobacterium* 属と考えられた。また2株は運動性(+)、チトクロームオキシダーゼ(+)、ブドウ糖を発酵的に分解したため *Vibrio* 属に該当した。残りの6株は Okuzumi *et al.*(1981)の簡易同定法では同定することはできなかった。(表1)

## (2) ヒラメおよびホシガレイ養殖水のバイオフィームにおける微生物の変動

上記の如くイシガキダイ循環濾過式水槽における細菌群の変動について実験を行い、バイオフィーム上の細菌群から抗菌・抗ウイルス活性を保持する細菌を分離することができた。今実験ではヒラメ(*Paralichthys olivaceus*)、ホシガレイ(*Verasper variegatus*)を飼育している循環濾過式水槽における細菌群の変動について調べた。

### 材料および方法

ヒラメ、ホシガレイ循環濾過式水槽において第2章で記述した方法を用いて、各々の水槽に設置したスライドガラス、さらに養殖水および生物濾過材から細菌を分離した。菌数は生菌数および直接計数法での総菌数を算出した。全分離菌株については抗 *Vibrio* 試験を行い、本試験で強い抗菌活性を示した菌株については抗ウイルス試験を行った。分離菌株の分類では簡易同定法に基づいて属レベルの同定を行った。

### 結果

バイオフィームと養殖水中の細菌数：循環濾過式ヒラメ水槽における水中細菌、付着細菌数の経時的变化を図5、6に示した。養殖水中の細菌数は平板法、直接検鏡法とも5日間において約5倍幅の変動があった、その値は各々最大で約  $2.5 \times 10^6$  cells/ml(生菌数)、 $6 \times 10^6$  cells/ml(総菌数)、最小で約  $6 \times 10^5$  cells/ml(生菌数)、 $1 \times 10^6$  cells/ml(総菌数)であった。水槽中に浸漬したスライドガラス上において、平板法では1日目に  $1 \times 10^6$  cells/cm<sup>2</sup>の細菌数が計数され、3~5日目では菌数の増加は滞り約  $2 \times 10^7$  cells/cm<sup>2</sup>の菌数となった。直接検鏡法によるスライドガラス上の総菌数は浸漬1日目では  $3 \times 10^6$  cells/cm<sup>2</sup>、5日目では  $6 \times 10^7$  cells/cm<sup>2</sup>となった。

また、循環濾過式ホシガレイ水槽における水中細菌、付着細菌数の経時的变化を図7、8に示した。養殖水中の細菌数は平板法、直接検鏡法ともにヒラメ水槽中の菌数よりも少なく、5日間通してほぼ一定しており、各々約  $1 \times 10^3$  cells/ml(生菌数)、 $6 \times 10^5$  cells/ml(総菌数)であった。水槽中に浸漬したスライドガラス上において、平板法では1日目に  $1 \times 10^5$  cells/cm<sup>2</sup>の細菌数が計数され、3~5日目では菌数の増加は滞り約  $8 \times 10^6$  cells/cm<sup>2</sup>

の菌数となった。直接検鏡法によるスライドガラス上の総菌数は浸漬1日目では $1.5 \times 10^6$  cells/cm<sup>2</sup>、5日目では $5 \times 10^7$  cells/cm<sup>2</sup>となった。

抗 *Vibrio* 試験：ヒラメ循環濾過式水槽において、スライドガラスの付着細菌9種、養殖水から2種、生物濾過材からは5種、計16株を単分離し、すべての分離株において抗 *Vibrio* 活性試験を行った。その結果、16株中6株は明らかな抗 *Vibrio* 活性を示した。

また、ホシガレイ循環濾過式水槽において、スライドガラスの付着細菌7種、養殖水から2種、生物濾過材からは6種、計15株を単分離し、すべての分離株において抗 *Vibrio* 活性試験を行ったが、15株中7株は強い抗 *Vibrio* 活性を示した。(表2)

抗ウイルス試験：抗 *Vibrio* 活性を保持する菌株で抗ウイルス試験を行った。供試菌株のうちVV-7、Net-1株は細胞変性効果(CPE)を抑制した(図9)。また、供試菌株上澄液がCHSE-214細胞のCPEを起こす例もあった。(図10)

分離菌株性状試験：ヒラメとホシガレイ水槽中から分離した、すべての分離菌株(31株)はグラム陰性細菌であった。それらのうち11株は運動性(+)、チトクロームオキシダーゼ(+)、ブドウ糖無発酵であり *Pseudomonas* III/IVに属すると考えられる。また、8株は運動性(+)、チトクロームオキシダーゼ(+)、ブドウ糖を好氣的に分解したため *Pseudomonas* I/IIに該当すると思われた。8株は色素産生(+)、運動性(-)、ブドウ糖無発酵であり *Flavobacterium* 属に、また2株は運動性(+)、チトクロームオキシダーゼ(+)、ブドウ糖の発酵的に分解により *Vibrio* 属に該当した。残りの2株は Okuzumi *et al.*(1981)の簡易同定法では同定することはできなかった。(表2)

異なった分離源(イシガキダイ、ヒラメ及びホシガレイ飼育槽)から採取した菌株中の抗菌性細菌数：イシガキダイ、ヒラメ及びホシガレイ飼育槽から分離した菌株の中で、抗病原菌、抗ウイルス性状を保持する菌株の割合は、浸漬したガラススライドや生物濾過材から分離した菌株間で高く、養殖水中からの分離株においては低い値を示した。また、抗ウイルス性状を保持する菌株は、上記ガラススライドや生物濾過材等の付着基盤上のみから分離された。この結果は、付着基盤上の細菌は、養殖水中の細菌と比較して、抗菌、抗ウイルス活性を保持する菌株の多いことを示唆している(表3)。

### (3) ガラススライド上の原生動物の出現

養殖水中にガラススライドを浸漬し、毎日における原生動物(繊毛虫、鞭毛虫)の数およびその種についての計数、同定を行った。

#### 材料及び方法

ガラススライドをヒラメ養殖水中に浸漬し、毎日その適当枚数を採取してスライド表



面上の原生動物を観察および計数した。計数は実体顕微鏡下において、1枚のガラススライドについて20の一定視野を選択し、視野中の原生動物を計数した。また原生動物の分類は、各個体を分離し、樹脂などの行動抑制剤を用いて光学顕微鏡下において観察、同定した。

## 結果

ガラススライド上に出現した繊毛虫の多くは、いわゆる匍匐を生活行動の主体としており、*Dysteria*, *Aspidisca*, *Holosticha*, *Dileptus*, *Euplotes*, *Diophrys*, *Strongylidium*, *Unornema*等に属す種が多かった。計数値では、浸漬5日後において無色鞭毛虫(動物性鞭毛虫)が $7.2 \times 10^5$  cells/cm<sup>2</sup>、全繊毛虫では $6.2 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup>と少なかった。ワムシ飼育水中や、有機物負荷の高い環境等に多く出現する繊毛虫種 *Uronema* sp.は、ガラススライド浸漬3日目に出現したのみで、その後の出現は見られず、これは餌の摂食能力に優れる *Holosticha*, *Dileptus*, *Euplotes*等の種が出現した結果、*Uronema* sp.の増殖が抑制されたものと考えられた。これらの原生動物の計数値より、ガラススライド上に付着する細菌に対する原生動物の摂食圧は、実験期間において小さいものと推定される。

### (4) 抗 *Edwardsiella tarda* 試験

#### 材料及び方法

イシガキダイ、ヒラメ、ホシガレイからの分離菌株の中で強い抗ウイルス活性及び抗 *Vibrio* 活性を示した菌株について抗エドワジエラ菌試験を行った。病原菌としては夏期の高水温時の養殖ヒラメ及びウナギにおいて大きな被害を生じるエドワジエラ原因菌、*Edwardsiella tarda*(ヒラメ由来 FPC498 養殖研究所病害防除部所有)を用いた。実験方法は抗 *Vibrio* 試験と同じように Maeda&Nogami (1989)の方法に基づいて行った。

## 結果

強い抗 *Vibrio* 活性を示した菌株においても抗 *E. tarda* 試験においては抗菌活性が見られない例もあったが、OP-1、OP-6 株には抗エドワジエラ活性が見られた。(表4)

### (5) 養殖水の銅イオンによる滅菌過程における細菌群の変動

上記に記述したように、養殖水中ではすべての微生物が病原菌ということはなく、有用細菌も多数生息している。しかし、水産養殖を行っている人々の多くはすべての微生物を有害と考えて取り除こうする現状がある。近年、養殖水滅菌方法として抗生物質、ホルマリン、マラカイトグリーン(遺伝子染色剤)等の薬剤及び紫外線オゾン滅菌、銅滅菌等の滅菌法が多用されている。本実験では、ヒラメ養殖場の銅イオン滅菌水における細菌群の変動を調査し、特に銅耐性菌の出現に関する研究を行った。

#### 材料および方法

## 細菌分離

ヒラメ養殖水を滅菌海水入り試験管中で十分に攪拌した後、 $10^{-1}$ ~ $10^{-6}$ の段階に順次希釈した。その希釈水を100 $\mu$ lずつ平板寒天培地(ZeBell 2216E)に接種し、この平板培地を20°Cで1週間培養した後、コロニー数(生菌数)を計数した。また同時に、ヒラメの腸内細菌も分離した。

## 分離菌株性状試験

分離菌株は Okuzumi *et al.*(1981)の簡易同定法に基づき、グラム染色性、運動性、形態、色素産生能、チトクロームオキシダーゼ反応、ブドウ糖発酵性の結果より属レベルの同定を行った。

## 銅イオン耐性菌試験

Casida (1992)が使用した培地を参考にし、ペプトン1g/l、酵母0.2g/l、寒天15g/l、塩化銅0.01g/lを海水に加え、pH 7.2に調節後、オートクレーブ滅菌した培地を銅寒天培地として本実験に使用した。単分離した細菌を本培地に塗抹し、1週間20°C下で培養後、分離細菌が増殖するか否かを判定した。

## 結果

細菌分離：養殖水中の生菌数はサンプリングの1回目、2回目において約 $5 \times 10^3$  cells/mlと極端に少なく、銅滅菌作用によるものと考えられる。腸内細菌数はそれぞれ約 $2.5 \times 10^4$  cells/ml及び $2 \times 10^4$  cells/mlであった。

分離菌株性状試験：養殖水からは計9株、ヒラメ腸内細菌からは計5株を分離した。そのうち3株は運動性(+)、チトクロームオキシダーゼ(+)、ブドウ糖無発酵の性状を示したため *Pseudomonas* III/IVに属すると考えられた。7株は色素産生能(+)、運動性(-)、ブドウ糖無発酵であったため *Flavobacterium* 属と考えられた。また4株は運動性(+)、チトクロームオキシダーゼ(+)、ブドウ糖を発酵的に分解したため *Vibrio* 属に該当した。(表 5)

銅耐性菌試験：分離菌株(14株)のうち銅寒天培地に増殖した菌株は11株であった。また、抗病原菌、抗ウイルス活性を保持し、同時に魚介類の成長促進効果をあらわす有用細菌は、銅イオンによってその増殖の阻害されることが明らかになった(表 5)。

## (6) 病原細菌による攻撃試験と有用細菌の疾病防除効果

### A. テラピアを用いた感染試験

#### 方法

#### 餌の投与

テラピア(30g、n=70)を徐々に海水に馴致させるために30%から順次10%ごとと海水濃度を上げ80%の濃度まで達した後、80%海水に18日間馴致させた。10

## 細菌分離

ヒラメ養殖水を滅菌海水入り試験管中で十分に攪拌した後、 $10^{-1}$ ~ $10^{-6}$ の段階に順次希釈した。その希釈水を100 $\mu$ lずつ平板寒天培地(ZeBell 2216E)に接種し、この平板培地を20°Cで1週間培養した後、コロニー数(生菌数)を計数した。また同時に、ヒラメの腸内細菌も分離した。

## 分離菌株性状試験

分離菌株は Okuzumi *et al.*(1981)の簡易同定法に基づき、グラム染色性、運動性、形態、色素産生能、チトクロームオキシダーゼ反応、ブドウ糖発酵性の結果より属レベルの同定を行った。

## 銅イオン耐性菌試験

Casida (1992)が使用した培地を参考にし、ペプトン1g/l、酵母0.2g/l、寒天15g/l、塩化銅0.01g/lを海水に加え、pH 7.2に調節後、オートクレーブ滅菌した培地を銅寒天培地として本実験に使用した。単分離した細菌を本培地に塗抹し、1週間20°C下で培養後、分離細菌が増殖するか否かを判定した。

## 結果

細菌分離：養殖水中の生菌数はサンプリングの1回目、2回目において約 $5 \times 10^3$  cells/mlと極端に少なく、銅滅菌作用によるものと考えられる。腸内細菌数はそれぞれ約 $2.5 \times 10^4$  cells/ml及び $2 \times 10^4$  cells/mlであった。

分離菌株性状試験：養殖水からは計9株、ヒラメ腸内細菌からは計5株を分離した。そのうち3株は運動性(+)、チトクロームオキシダーゼ(+)、ブドウ糖無発酵の性状を示したため *Pseudomonas* III/IVに属すると考えられた。7株は色素産生能(+)、運動性(-)、ブドウ糖無発酵であったため *Flavobacterium* 属と考えられた。また4株は運動性(+)、チトクロームオキシダーゼ(+)、ブドウ糖を発酵的に分解したため *Vibrio* 属に該当した。(表 5)

銅耐性菌試験：分離菌株(14株)のうち銅寒天培地に増殖した菌株は11株であった。また、抗病原菌、抗ウイルス活性を保持し、同時に魚介類の成長促進効果をあらわす有用細菌は、銅イオンによってその増殖の阻害されることが明らかになった(表 5)。

## (6) 病原細菌による攻撃試験と有用細菌の疾病防除効果

### A. テラピアを用いた感染試験

#### 方法

#### 餌の投与

テラピア(30g、n=70)を徐々に海水に馴致させるために30%から順次10%ごと海水濃度を上げ80%の濃度まで達した後、80%海水に18日間馴致させた。10

0%海水にした場合、かなりの確率で斃死する個体が認められたので海水80%で馴致をやめた。馴致後、各試験水槽に20尾ずつ収容した。馴致期間は1日あたり総体重の1.0%の餌(g; 30X70=2100g; 2100X0.01=21g)を投与した。試験開始時には魚体重は平均33gになっていた。馴致後各試験区にそれぞれ20尾を収容した。試験期間中の投餌量は魚体重の2%を投与した。

細菌AをZobell培地で25度1日培養した後、13.2gのえさに魚油を同様に加え乾燥した後、3mlの細菌培養液を浸し十分吸収させた後乾燥させ投与した。対照の餌にはたら肝油のみを加えたものを使用した。投餌は1日1回、満遍なく行き渡るようにして2週間投与した。2週間後各5尾を取り上げると共に食食作用を調べ、さらに残りの15匹をテラピア由来β溶血性連鎖球菌(*Streptococcus iniae*)で感染させた。感染後2週間斃死をみた。試験期間中水温は25度に設定した。

#### 食食作用

取り上げたテラピアの腎臓をハンクス液(Ca,Mgイオン不含、ヘパリン100U)でホモジナイズし、スライドチャンバー(ヌンク)に白血球を25度で1時間付着させた。スライドガラス上の赤血球等を除くためにハンクス液でリンスした。予め健康なテラピア2尾から分離していた血清1mlとβ連鎖球菌*Streptococcus iniae*のホルマリン死菌1ml( $1 \times 10^9$ cfu/ml)を混合し25度で1時間反応させオプソニン化した。オプソニン化した菌体をハンクス液で約 $10^8$ cfu/mlに調整した。スライドチャンバーにオプソニン化した菌液を0.1ml加え、25度で90分反応させた。反応後、メタノール固定した後ギムザ染色をして付着細胞200個あたり5個以上の連鎖球菌を食食している細胞数を顕微鏡下計測し、食食している細胞を陽性とした。

#### 感染試験

5尾を食食作用にとりあげた後、残りの15尾の魚に溶血連鎖球菌を $1 \times 10^7$ /魚の濃度で注射感染させ斃死尾数を検討した。感染後は餌を投与しなかった。

#### 結果

食食作用：食食作用の試験結果は、表6に示した。細菌A区では対照区と比較して有意に平均値に差が認められた。感染試験の結果(表7)は、細菌の投与区は対照区よりも低い斃死数を示した。

#### **B. ヒラメ感染実験**

ヒラメ8g(各区10尾)を水槽6個に収容し、3週間馴致させた。3週間後ヒラメは10gとなっていた。試験は、馴致後細菌A,BをZoBell培地で25度で24時間培養後ヒラメの餌に混合し投餌し、2週間飼育した。餌は体重の3%約3gに菌液それぞれ1mlを加え軽く乾燥させ投与した。2週間後、ヒラメ由来ビルナウイルスを注射および浸漬によって感染させた。注射感染ではヒラメの腹腔内に0.05ml注射し感染させた(約 $10^8$ (TCID50)/ml)、感染後14日間斃死を観察した。浸漬感染では $10^7$

TCID<sub>50</sub>/ml になるように海水で希釈して30分感染させた。感染後餌は投与しなかった。水温は試験期間中、18度に設定した。また、注射感染魚に関しては、生残魚のウイルス保有の有無をしらべるためにCHSE-214細胞をもちいて生残魚の脾臓、腎臓、肝臓をまとめてホモジナイズし、ウイルスを分離した。

## 結果

各試験区におけるヒラメ由来ビルナウイルスの感染系において、注射感染後の魚の生残率（表8）および生残魚のウイルス分離率（表9）を示した。対照区と細菌添加区との間では値の差は小さいが、細菌添加実験区において生残率、ウイルス分離率の低下する傾向がみられた。

### （6）考察

魚の養殖を行っている人々の多くが、微生物を悪者と考えて取り除こうとする。人間の生活でも衛生管理のためには消毒剤の散布をおこない、多くの微生物を退治する。通常の間生活では、消毒を常時おこなっているわけではないので弊害は目立たないが、薬剤を頻繁に使用する病院では、薬に対して抵抗する病原菌に原因する院内感染が大きな問題となっている。これが畜産業や水産養殖業となると薬の使用回数と量が多いので、院内感染が常時起きているような状況となる。そして今、薬剤を多用しても家畜、魚の病気がなおらない事例が数多く起こっている。

実は、薬を使えば使うほど魚が病気になってしまうという自然界の仕組み（落とし穴）がある。ウイルスと細菌との関係を見ると、ウイルスの感染を抑制する微生物（拮抗微生物）は海水中には多数生息している。ところが、抗生物質は細菌を殺すことはできるが、ウイルスには効かない。このため、薬剤の使用によってウイルスを抑制する細菌、すなわち善玉菌が減ぼされてしまい、ウイルスは残る。こうして、いままで善玉菌に押さえつけられてきたウイルスはのびのびと活動することができ、魚に感染する。薬剤を与えて、言い換えればコストを費やして魚を病気にしてしまうようなことが現実に行われている。

しかし、善玉菌を増殖させる方法を講じれば、悪玉菌が減少し疾病は起きないという考え方があり、このような有効な善玉菌は大別するとプロバイオティクスとバイオコントロール製剤とになる。私たちの研究において、世界で初めて魚の成長促進（プロバイオティクス）効果をあらわし、同時に病原菌の増殖を抑制（バイオコントロール）、さらに海底土のヘドロなどの有機物を分解する有効な機能を保持した微生物を発見し、1988、1989年に報告した。その後13年余が経過したが、この間に同じような微生物の探索と水産増養殖への実用化例が数10編の論文で報告されている。

本考察では、有用微生物における増養殖魚介類の成長促進と疾病の防除効果、及び有用微生物を発見した背景と経緯、増養殖環境の向上及び海藻の増殖促進効果等について述べる。

## プロバイオティクスとバイオコントロール製剤

プロバイオティクスの用語は、当初 1960 年代において原生動物の生産する物質で他の原生動物の増殖を促進する因子として提唱された。その後 1970 年代にこの用語は、動物の腸内細菌相に効果的な作用を及ぼす栄養補助剤として用いられ、さらに 1990 年代初頭に「宿主の腸内細菌相組成を宿主の健康増進あるいは成長促進に有効な状態に保つ微生物餌料」と定義されている。プロバイオティクスの意義は、無菌の動物はより容易に罹病することからも推察できる。健康な成長したニワトリの腸内容物や糞を溶液にして若鶏に投与した場合、若鶏の病原菌 *Salmonella infantis* への抵抗性が増大する例もある。若鶏の消化管に新しく構成された細菌群が *S. infantis* の侵入、定着を阻止したと考えられている。また、幼児に弱毒化した少量の病原菌 *Staphylococci* を投与すると、病原性 *Staphylococci* の感染が遅延、あるいは防止される。

一方、生物防除（バイオコントロール）では自然界に進行している生物間の拮抗作用を利用する。多くの場合は、病原生物に対して天敵生物を増殖させ、疾病の防除を行う。農業領域における生物防除方法では、天敵生物を外部より移入させる直接的な技術

（Classical or Augmentative biocontrol）と、有害微生物を阻害するあるいは低減するような植物を栽培する等して当該生産対象植物を保護するといった間接的生物防除技術

（Conservation biocontrol）が行われている。このような生物防除に使用する天敵生物をバイオコントロール製剤、あるいは農業領域ではバイオ農薬とよんでいる。

プロバイオティクスは、歴史的に乳酸菌が食品としても安全であるという概念により選択され、長期間使用されてきた経緯がある。乳酸菌 (*Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium thermophilum*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus delbrueckii* subspecies *bulgaricus*, *Lactobacillus plantarum* 等)では、生体防御能の増進さらに消化管内で優占して侵入する病原菌を防除するような効果が報告され、さらに細菌細胞壁のペプチドグリカンには免疫能の向上効果が証明されている。これらの主たる機序はマクロファージの活性化であったり、微生物の生産する酵素が食品と反応して様々な生産物を生成し、生体に影響を与える作用であったりする。

プロバイオティクスは病原菌を攻撃し、その増殖を阻害する作用を保持するとはかぎらないため、バイオコントロール製剤（Biocontrol agents）とは区別される。さらにプロバイオティクスは病原生物の天敵である必要はなく、他の微生物を排除する作用は拮抗作用によるというよりは、場の競合などにより結果として病原菌の定着を阻害するプロセスとされている。またプロバイオティクスは宿主の健康増進効果を発現するが、かならずしも宿主の成長促進能を保持するとはかぎらない。このような観点より、バイオコントロール製剤の定義としては、「自然界に分布する微生物、昆虫等で、病原生物を殺滅するか、その増殖を阻害する作用を及ぼし、同時に生産を目的とする生物に対しては少なくとも無害であるか、あるいは成長促進、代謝増進効果を及ぼす生物」とすることができる。

### 魚類消化管内のプロバイオティクスと拮抗微生物

魚類消化管内壁は微生物の付着やコロニー形成、微生物への栄養の供給等において有効な場となっている。他方、消化管において高い濃度で分布する細菌は、病原菌の付着、増殖、コロニー形成等を防止するなどの働きをしている。魚類消化管微生物は、他の動物と同様に固有の種が定着し、周囲の環境水中の微生物相とは異なるとの報告がある。例えば、海産魚の消化管内微生物では *Vibrio* と *Pseudomonas* 属の菌が優占し、淡水産魚類では *Aeromonas* や *Plesiomonas* 属の菌が優占する。他にアワビ消化管中の細菌は *Enterobacteriaceae* 科が優占するした報告もある。他方では、魚類消化管の微生物は、餌料や環境水中の微生物が生息したものとする報告がある。例えば野外で捕獲した魚の腸内細菌は、当初は *Vibrio* spp. が優占し、*Bacillus* や *Lactobacillus* が低頻度で出現するが、1年間飼育した後は *Pseudomonas* spp. が優占し、*Vibrio* 種はほとんど出現しない。私達の研究では、微生物を餌に混合して魚に与えた場合には、この投与した微生物が腸内に一定期間定着することが分っているが、微生物の投与を止めると腸内の微生物は他のものにかわってしまう。この結果は、上記2つの考え方において両者に部分的に一致するといえる。

貝類については興味深い実験がある。イガイ (*Mysis stenolepis*) に  $^{14}\text{C}$  でラベルしたセルロースを投与した場合、通常はセルロースを消化するが、イガイを24時間抗生物質処理するとセルロースの取り込みはなくなる。しかし、健康なイガイ消化管をこの抗生物質処理した個体に与えた後では、セルロースを取り込むようになる。これらの結果は、消化管微生物の働きを抗生物質が抑制した場合にはイガイのセルロース消化、摂取能が失われることを示しており、植物プランクトン等のセルロース含有餌料の消化における消化管微生物の重要性が示唆されている。なお、魚類についても同様の報告例がある。

さらに、卵黄を保持した成長段階にある魚類稚仔に有用微生物を投与すると、その後魚が成長する段階で消化管内微生物相が遷移しても投与した微生物が生存しつづける。このため幼生の早い時期に有用細菌を投与して消化管内に定着させることは、魚類の生存にとって有利であるとした研究もある。

プロバイオティクスの増殖を促進し消化管中に定着させる物質、プレバイオティクスも注目されている。プロバイオティクスのみの投与では、いずれ常在細菌がこれらを駆逐してしまうため、プロバイオティクスを消化管中において増殖させることが必要となる。プレバイオティクスは宿主には消化困難であり、かつ消化管微生物には栄養となる等の有益な作用を及ぼす。一般に、哺乳動物には消化されにくい糖であるオリゴ糖 (oligosaccharides, fructooligosaccharides) が使用されている。この糖は、ビフィドバクテリア (*bifidobacteria*) の栄養となり、糖投与後には本菌が糞便中において優占種となる。魚類においては、リノレン酸を大西洋サケに投与すると糞中の細菌数が変化するした報告があり、この投与によりグラム陰性菌である *Aeromonas*, *Pseudomonas*, *Vibrio* 属の種が増加し、グラム陽性菌である *Lactobacillus* spp. の出現は抑制された。

## 水産増養殖におけるバイオコントロール（生物防除）

水産増養殖のバイオコントロール製剤研究は、以下の4つの研究レベルに分けることができる。

1. 有効微生物が病原菌の増殖を阻害するが、魚介類成長へのかかわりは明らかにされていない研究。
2. 病原菌の増殖を阻害し、かつ魚介類には無害である微生物の研究。
3. 病原菌の増殖を阻害し、かつ魚介類の成長促進効果のある微生物の研究。
4. 上記3つの研究において、さらに菌株が分類同定され、人体に対しても無害であるとした研究。

以下に、これらの研究例を示す。

### (a) 病原細菌の防除

魚病細菌 (*Vibrio*, *Aeromonas*, *Pasteurella*, *Edwardsiella*, *Yersinia*, *Pseudomonas* 属の細菌) の防除を目的として、抗菌性を示す細菌株の病原菌への増殖阻害作用をしらべた報告では、多くの病原菌が供試菌に対して感受性を示したが、病原菌の2株 (*Edwardsiella tarda* と *Pseudomonas aeruginosa*) は全ての供試菌に耐性を示した。*Bacillus* sp. を濃度  $10^4 \sim 10^5$  cells/ml になるように、160日間ウシエビ養殖池に投与したところ、*Vibrio* 属菌数、特に病原性があるとされている発光性 *Vibrio* 菌数が減少し、またエビ養殖池底中の *Vibrio* 菌数も減少したとした報告、また *Aeromonas* 属の一種が魚やエビの病原細菌に対して強い拮抗作用を示した例等、いくつかの研究があるが、これらの研究では、試験した菌株が魚介類に対してどのように作用するのか、その代謝等を阻害しないのか等が明らかにされていないので、現場養殖への実用化にむけた十分な知見が得られているとはいえない。また、いくつかの商品として *Bacillus* 菌を組成としたバイオコントロール製剤が販売されているが、本菌は細胞壁が厚く、消化が困難であることも理由となり、魚介類幼稚仔の成長を阻害することが報告されている。

これに対して次の研究例では、供試菌の病原微生物に対する拮抗作用とともに、魚介類への影響についても調べている。これらの研究には、*Carnobacterium* sp. が消化管の中で生存し、病原菌 *Vibrio anguillarum* と *Aeromonas salmonicida* を阻害し、供試菌の魚類への阻害作用はなかった例、fluorescent pseudomonas は、魚体には無害であり、本菌は鉄イオンの吸収により他の微生物、例えば人為的に感染させた *Aeromonas salmonicida* の増殖を抑制した例（この作用は、3価鉄イオン輸送因子であるシデロフォアによるものであり、シデロフォアを持つ微生物が環境水中の鉄イオンを消費するため、結果として鉄イオンを要求する他の微生物の増殖を阻害する）等がある。

微生物による病原菌防除とともに、使用した菌株が魚介類の生残率向上効果をあらわすとした研究成果では、分離菌が *Vibrio* 菌3種の増殖を阻害し、中でも1株は強い阻害活性を示すとともに、カキの成長への阻害はなかった例がある。この事例では病原菌



*Vibrio alginolyticus* による攻撃試験において、有用菌の存在下でカキ幼生の 70%が生残したが、有用菌の存在しない条件での生残率は 8%であったと報告している。しかし、この研究では供試菌はカキ生残率向上には有効であったが、使用した菌株の分類同定が行われていないので、人間への毒性の有無が危惧される。

上記の事例に対して、使用した菌株の分類にまで研究を展開した報告例も多いので、引用文献を付して述べる。Riquelme(1996)は、*Alteromonas haloplanktis* の培養静止期の培養液上澄が病原菌の増殖を抑制したと報告している。この抑制効果は、*A. haloplanktis* の培養初期および対数増殖期の培養上澄にはみられない。この有効細菌に魚類幼生を 1 時間浸漬した場合、病原菌 *Vibrio sp.* への抵抗効果があらわれたが、24 時間浸漬の場合では無浸漬の場合との相違はみられなかった。Austin 等 (1995) の報告では、バイオコントロール製剤としての *Vibrio alginolyticus* 培養液上澄の凍結乾燥粉末は、病原菌 *Vibrio ordalii* を阻害し、その数が急激に減少した。さらに、他の病原菌 *Aeromonas salmonicida* と *Vibrio anguillarum* の阻害効果もみられた。しかし、*Yersinia ruckeri* に対しては阻害効果はなかった。彼らは、このバイオコントロール製剤を太平洋サケに投与したが、その結果病原菌 *Aeromonas salmonicida* の攻撃試験において魚体の抵抗性が増大した。しかし、*Vibrio anguillarum* と *V. ordalii* に対する感染抑止効果は低かった。Gram 等 (1999) の報告では、鉄イオン制限下で培養した *Pseudomonas fluorescens* の培地上澄は *Vibrio anguillarum* の増殖を抑制したが、鉄分が豊富にある培地中で培養した場合の上澄には阻害効果はない。しかし、*P. fluorescens* の細胞数が *V. anguillarum* 細胞数より 100~1000 倍多い場合には *P. fluorescens* は *V. anguillarum* の増殖を阻害した。さらに彼らは、 $10^5 \sim 10^7$  cells/ml の *P. fluorescens* をニジマス飼育水中に添加し、5 日間飼育した後  $10^4 \sim 10^5$  cells/ml の *V. anguillarum* の攻撃試験を行った結果、生残率が向上したとしている。Robertson 等(2000)によると、病原菌に対して拮抗作用を保持する細菌 *Carnobacterium sp.* を配合飼料に混合してサケ科魚類に投与したところ、投与菌は消化管内で生存していた。14 日間投与した後の *Aeromonas salmonicida*, *Vibrio ordalii* や *Yersinia ruckeri* 等の攻撃試験では、サケ科魚類の生残は無投与の魚の生残率よりも向上した。しかし、*V. anguillarum* の攻撃試験では魚の生残率の向上効果はなかった。Nikoskelainen 等(2001)によると、乳酸菌 *Lactobacillus rhamnosus* を  $10^9$  と  $10^{12}$  cells/g-feed (配合飼料) の濃度でニジマスに 51 日間投与し、投与 10 日目にせつそう症をおこす病原菌 *Aeromonas salmonicida* の攻撃試験を行ったところ、細菌無投与実験区の死亡率は 52.6%であったが、投与実験区では 18.9%( $10^9$  cells/g-feed 濃度の場合)と 46.3%( $10^{12}$  cells/g-feed 投与)となった。Gibson 等 (1998)によると、バクテリオシン様の阻害物質を生産する *Aeromonas media* は病原菌 *Vibrio tubiashii* のカキへの攻撃に対して防護する効果を示したが、*A. media* 無投与の実験区ではカキは 5 日後に死滅した。また、*A. media* 単独の場合はカキの生残への影響は見られなかった。

*Bacillus sp.* の胞子をワムシに与えた場合、無投与のワムシ培養水中の細菌相では *Vibrio* が優占していたが、投与区の細菌相においては多様な菌相を示した。このワムシ

をカレイに与えた 10 日後では、成長と生残率とが向上した(Gatesoupe, 1991)。Munro 等 (1995)も、*Aeromonas* sp.をワムシ培養水中に添加した場合、*Vibrio anguillarum* 数が減少したと報告している。

Maeda (1988), Maeda & Nogami (1989), Maeda & Liao (1992), Maeda 等 (1992)、Nogami & Maeda (1992), Maeda and Liao (1994), Maeda (1999)は養殖水中より分離した菌株 *Thalassobacter utilis* と *Pseudoalteromonas undina* がエビ(*Penaeus monodon*)、カニ(*Portunus trituberculatus*)等の成長を促進するとともに、病原微生物への拮抗作用を示すことを報告した。この、*P. undina* はシマアジ(*Caranus delicatissimus*)の生残率の向上およびウイルス疾病の防除効果も示した(Maeda 等、1997)。さらに、*Thalassobacter utilis* は養殖水中に出現した真菌の増殖も抑制した(Nogami 等, 1997)。

#### (b) ウイルスの防除

ウイルス病は増養殖産業に甚大な損害を与えている。クルマエビ科のエビ *Penaeus monodon* や *P. japonicus* の生産はバキュロウイルス病で被害を受けており、特に台湾で 1988 年に発生した本疾病でウシエビ生産量が前年の約 90,000 トンから 30,000 トン(1988 年)、20,000 トン(1989 年)に減少した。また、1993 年に発生したクルマエビウイルス病では、九州、瀬戸内海を中心としたクルマエビ産業に大きな損失を与えている。これらのエビウイルス病の規模は、その後も拡大しており、東南アジア、南米エビ養殖の生産阻害要因の一つとなっている。この他にもサケに感染する IHNV や IPNV、ヒラメに感染する Rhabdo ウイルス(HIRRV)、ブリに感染するブリ Ascites ウイルス (YAV)、シマアジの Nervous Necrosis ウイルス (SJNNV)、タイに感染する Irido ウイルスや、他にもいくつかの問題となる病原ウイルスがある。

抗ウイルス細菌の養殖環境への利用については、*Pseudoalteromonas undina* をウシエビ及びシマアジ種苗生産水に約  $10^6$  cells/ml の濃度で添加したところ、生残率が向上し、一方微生物を投与しない生産区では種苗は斃死した(Maeda & Liao, 1994; Maeda *et al.*, 1997; Maeda, 1999)。Yoshimizu & Ezura (1999)は、抗ウイルス細菌をマス、ヒラメやマツカワの消化管より分離した。試験した虹マスやマスは、抗ウイルス機能を持つ *Aeromonas* sp.を投与した後では、人為的 IHNV の攻撃試験に対してより強い耐性を示した。

上記のように、自然海水中及び魚介類体内には拮抗作用を示す微生物が多く分布し、その相互作用において微生物相の平衡が成立すると考えられるが、薬剤の使用や紫外線、オゾン等の水処理によってこの微生物間平衡関係がくずれることがありうる。特に危険な事例としては、薬剤使用の場合には耐性菌の出現と共に、病原菌を抑制する役割を担っている微生物群を系外に除去してしまうことになり、薬剤耐性をもった病原菌の増殖がより加速される。このような状況においては、環境水中の微生物を制御して疾病を防除する方法(バイオコントロール)研究のさらなる進展が必要となるであろう。さらにバイオコントロールは水産における薬剤使用制限の強化、あるいは消費者の食の安全に

対する危惧感などに対応する方法にもなる。なお、私たちが探索、使用した有用細菌のすべては一般的な栄養源で生育し、温度や酸素量等の培養条件においても通常の微生物との相違点は少ない。この善玉菌を有効に使用することにより、低・無投薬養殖魚（ブランド魚）の供給と、養殖コストの削減が可能になると考える。

#### 海水中のウイルスの分布とその消長

従来海水中に分布するウイルスの計数は、細菌株を混釈して作製した寒天平板培地上でのウイルスによる透明プラークの形成に基づいて行われ、この方法では通常 1~10 ウイルス粒子/ml の計数値が得られる。これに対して電子顕微鏡を使用した場合の計数値は大幅に高くなり、Bergh 等(1989)は海水、淡水中のウイルス計数値は、 $10^4$ ~ $10^8$  ウイルス粒子/ml の間で変動すると報告した。この研究に先だって、同様に電子顕微鏡による観察で海水中のウイルスの分布数が予想外に多いとした Fauré-Fremiet 等 (1963)の報告例がある。Fauré-Fremiet 等は、カニ(*Cancer pagurus*)に付着している繊毛虫 *Zoothamnium alternans* の細胞表面に多数の細菌が生息していること、この細菌内に大量のバクテリオファージが観察されたことを述べている。この他にも海水中のウイルスの分布についてはいくつかの報告がある(Heldal & Bratbak, 1991; Weinbauer 等 1995; Steward 等, 1996)。

一方、人間に感染するウイルスの海水、海底土における消長に関する研究も多く、病原性ウイルスは下水処理場に隣接する沿岸水や海底土に分布することが明らかにされた(Gerba 等, 1977; LaBelle & Gerba, 1980)。これらのウイルスの生存（活性保持）期間は海底土中においては、海水中よりも長いこと(Smith 等, 1978)が報告され、さらに LaBelle & Gerba (1979)は、異なる pH、塩分濃度、有機物濃度におけるウイルスの海底土への吸着と遊離についてしらべ、海底土に添加した poliovirus, Coxsackievirus, echovirus, rotavirus の 99%が強弱はあるが吸着されたと報告している。また Gerba & Schaiberger (1975) は、大腸菌バクテリオファージは、海水中に粘土 kaolinite を加えた場合には失活しにくいとしている。

下水の流入する沿岸水域に生息する貝類(カキ、イガイや他の 2 枚貝)個体内からは、人間の病原性腸内ウイルス(polio, echo, Coxsackie, reo ウイルス等)が検出される。例えば Coxsackie 等の腸内ウイルスは、下水処理場から 4 マイル離れた海水中に生息するカキ (*Crassostrea virginica*) から分離され、このカキを 5°C で保存した場合、貝体内のウイルスの感染能は少なくとも 28 日間は維持された。カキの各組織の中で消化管中にウイルスが最も多く保持されていたが、しかし各組織においてウイルス数が増加する傾向は見られなかった(Metcalf & Stiles, 1965)。この結果から彼らは貝類がウイルスのベクター（運び屋）としての役割を担い、ウイルスを体内において安定的に保持していると推論している。

#### 海水中におけるウイルスの不活化

海水（淡水）中のウイルスの不活性化については、人体に感染す病原性ウイルスの消

長についての知見が蓄積されている。Matossian & Garabedian (1967)によると、表層海水によってポリオウイルスは6~9日で不活化した。しかし、海水をメンブレンフィルターで濾過した場合には、この不活性化の効果は失われた。この報告は、メンブレンフィルターによって除去されてしまう微生物等の因子がウイルスの不活性化に関与していることを示唆している。ポリオウイルスとサケウイルス(salmonid viruses)では、海水中でサケウイルスがより長く生存したが、淡水中ではポリオウイルスの方が安定していた(Tranzo & Hetrick, 1982)。また、LaBelle & Gerba (1980)、Toranzo 等 (1982) は、ポリオウイルスの感染力は海水中に海底土を添加した場合には、無添加の場合よりも長く維持されることを明らかにした。この効果は、ウイルスが底土粒子に吸着することにより、微生物からの攻撃の度合いが減少するためと推論している。この他にも、海水中の物理化学的要因によるウイルスの不活性化について塩分、濁度(懸濁物)、光線等の影響に関する報告がある。

#### 海水中の微生物によるウイルスの不活化

Tranzo 等(1983a, 1983b)は、Infectious Pancreatic Necrosis Virus (IPNV)について、海水中のウイルス不活性は、海水中の微生物数が多い場合に増大すると報告し、Fujioka 等(1980)もウイルスを不活化する海洋微生物の存在を示唆した。これらの研究に先立ち、Gundersen 等(1967)は既に海洋細菌の保持するウイルス不活性能すなわち VIC (Virus Inactivating Capacity) を報告し、この活性を保持する細菌は *Vibrio* sp. であるとした。*Vibrio marinus* の抗ウイルス活性は、4~12°Cにおいて培養した場合に発現するが、25°C培養においては発現しないと報告もある(Magnusson 等, 1967)。同様に、海洋細菌の抗ウイルス活性は Kamei 等(1987)、Direkbusarakom 等(1988)によっても報告されているが、一方 Suttle & Chen (1992)は、海洋微生物の抗ウイルス能について否定的な結果を報告している。

Tranzo 等(1983a)はウイルス不活性化物質について以下の研究を行った。*Pseudomonas* sp. と *Vibrio* sp. の対数増殖期における培養上澄液には、ポリオウイルスのカプシドを分解(あるいは損傷)する活性が検出された。すなわち、上澄液を作用させたウイルスは(1)宿主細胞への感染力が減少した。(2)RNA 分解酵素への感受性が増大、すなわち RNase 酵素作用によってウイルスから RNA の溶出量が増大した。(3)  $^{14}\text{C}$  でラベルしたウイルスでは、細菌培養上澄液の作用により、その 85~90%の  $^{14}\text{C}$  関連物質が 2~5nm ポアサイズのフィルターを通過した、と報告した。一方 Herrmann & Cliver (1973) によると、細菌が生産するウイルス不活性化物質は蛋白質分解酵素(プロテアーゼ)であり、この酵素がウイルスのカプシドを分解することによりウイルスを不活化したとしている。

#### 養殖水中からの抗ウイルス細菌の分離

前報(日本水産資源保護協会月報 2004 年 2 月号)で、無菌的に飼育した動物は病原菌の攻撃に対する抵抗力が弱く、また、魚類の飼育環境水および消化管中には病原菌に

対して拮抗作用をしめす細菌が多く生息することを述べた。これらの有用な拮抗微生物を分離する場合に、仮に、寒天平板法で1つの海水試料から10種類の細菌を分離したとすると、いくつかの養殖池からは容易に数100コロニーの株を得ることになる。このような状況下で、魚介類の成長を促進し、かつ病原微生物の増殖を抑制する有用微生物を短期的に、しかも可能であれば少ない供試菌数において探索・分離するためには、分離する場の選択が重要となる。根圏微生物が適当な細菌相で構成されている場合には、植物がよく成長する事例と同様に、魚介類の成長促進効果等をあらかず微生物の分離では、当該魚介類が順調に生育している飼育環境を分離源とすることが適当であろう。このような好適環境では、魚介類の成長に有効な細菌群が多く生息している可能性がある。他方、疾病の発生している飼育環境では、病原菌等が優占している場合が考えられる。しかし、魚介類が生育している好適環境といえども、病原菌が皆無ということではなく、病原菌、有用細菌をふくめた細菌群集において、細菌間の相互作用の結果としての平衡関係がなりたっていると考えべきであり、この点では好適環境からも病原菌が分離される可能性は充分にある。

病原細菌に拮抗作用を示す菌株の検定では、寒天平板培地を用いた方法が簡便といえる。すなわち供試菌を2本のスミアとして一方の寒天平板培地に移植し、その2本のスミア間に病原菌を移植する。他方の平板培地には病原菌のみを移植する。供試菌が抗菌能を保持する場合には、スミア間に移植した病原菌の増殖量は対照区のスミアよりも小さくなる。次に抗ウイルス活性の測定においては、多くの事例で強い抗菌力を保持している有用微生物は抗ウイルス活性を示すことが判明している。抗ウイルス活性測定のためには魚類細胞を培養し、その培養細胞に病原ウイルスを感染させ、さらに有用細菌の菌体培養液上澄を抗生物質とともに加える実験系を作成する。供試菌培養上澄に抗ウイルス活性がある場合には、ウイルス感染による細胞の崩壊が抑制される。このような実験系では、複雑な操作が必要であるため、検定にかなりの時間を費やすことになる。このため、最初に抗菌力テストによって菌株を選択し、続いて、この抗菌活性を保持している株に対して抗ウイルス能の検定を行うことで、時間、費用の節減が可能となる。我々の結果でも、抗 *Vibrio* 活性を保持する菌株の大半は、強弱はあるものの供試ウイルスの感染抑制能を保持していた。

これらの拮抗細菌が魚介類に対して少なくとも無害か、あるいは摂食されて魚介類の成長を促進するかの検定は、上記抗菌テストと同時に行うべき必須事項となる。魚介類幼生は短時間に急速に成長し変態を行うので、幼生の形態的特徴を基にすれば、検定に供した細菌株が幼生の成長を促進あるいは阻害しているかを容易に判定することができる。また、細菌を蛍光色素で染色して幼生に投与し、消化管部分を蛍光顕微鏡で観察すると、幼生が細菌を摂食した場合には細菌の発する蛍光を確認することができる。しかし魚介類幼生は、しばしば無差別に餌飼料を摂食し、その後未消化のため斃死することがあるので、例え消化管中に細菌の塊が確認されても好適餌料とは確定できず、幼生の成長や変態を指標とした判定方法をあわせて用いることが必要となる。

## 微生物ライン

微生物ラインとは、ケイ藻やワムシ等の餌料生物の増殖を促進する微生物が、同時に魚介類の餌料となり、さらにプロバイオティクスやバイオコントロール製剤として魚介類の生存に有効に作用する過程をあらわしている。この微生物は、また、魚介類の糞などと共に排出され海底に沈降して海底土のヘドロ等有機物を分解する。一方、これらの微生物は隣接する藻場等において大型海藻の生長促進因子となる。このように同一微生物がいくつかの異なった食物連鎖栄養段階生物に対して有効に作用するプロセスを微生物ラインと定義する。

### (a) 餌料となる微生物

少量の有機物を加えた海水でエビ、カニ幼生を飼育すると、幼生の生残率と脱皮率が向上する。この技術は種苗生産における「水作り」として知られており、このような飼育水からはエビ、カニ幼生の生残、成長、脱皮向上効果のある細菌が分離された(Maeda & Liao, 1992 ; Maeda 等, 1992)。この結果は、有機物の添加により細菌類が増殖し、その中にエビ、カニに対して有用な種が存在していることを示唆している。ここにおいて微生物を中心とした微生物食物連鎖が重要となる。

海洋生態学の研究がはじまって以来、長い期間にわたって食物連鎖への理解が十分ではなかったため、大半の植物プランクトンが直接的に動物プランクトンや魚介類稚仔の餌料になると考えられてきた。このため、例えば養殖においても魚類の主たる餌料として微細藻類が使用されてきた。この微細藻類餌料は魚類消化管内において色素のかたまりとして識別されて、摂食していることが確認されるが、魚類は結局は無投餌の魚と同じ期間しか生存できずに死亡する。エビ養殖においてもケイ藻が餌料として投与されるが、対数増殖期のケイ藻をエビは摂食せず、ケイ藻が増殖停滞期や死滅期になった、いわゆる増殖の衰えたケイ藻細胞をエビはよく摂食することが知られている。事実、エビ、カニの餌料としてケイ藻に細菌株を混合して投与した場合には、その生残率はケイ藻のみを与えた場合と比較して大幅に向上することが判明している (Maeda & Liao, 1992)。

自然海水中ではコペポダやオキアミのような動物プランクトンの抱卵数や幼生生残率は、植物プランクトンと共にデトリタスや原生動物を投与した場合に増大する。自然界全体でも、例えば森林では葉を直接餌料とする、すなわち樹木の生育している葉からの食物移行プロセス (エネルギーフロー) の割合は大変に小さく、大半のエネルギーは落葉が微生物によって分解する中で原生動物、昆虫等の微小あるいは小動物へと移行する。このように構築された物質サイクルによって、樹木や肉食動物、鳥類が生息する豊かな森林生態系が維持されることになるが、その根幹の一つには微生物から発する食物連鎖があり、近年海洋においても同様の食物移行過程が主たる経路であるとの認識に到っている。例えば、植物プランクトンが光合成によって生産する細胞外溶存態有機物 (DOM) 量は植物プランクトンの全光合成量の数 10% (20~40%) になると試算されており、この植物プランクトンが生産する DOM の約 60%が微生物に取り込まれるとし

た報告もある (Williams, 1981)。この他にも魚介類や動物プランクトンの摂食時に生産・排出される DOM や糞中から溶出する DOM があり、これらの DOM を総称して DOM プールと表現する。そして、この DOM プールを利用して微生物、原生動物群等が増殖し、食物連鎖の出発点となる。すなわち、海洋において植物プランクトンは、餌料としての役割よりは有機物の生産者としての役割を担い、餌料となる生物はこれらの有機物を摂取して増殖する微生物等とする食物経路が重要視されている。これは、上述の森林生態系における食物連鎖と同様のエネルギー移行経路でもある。

この微生物から発する食物連鎖は、これまではデトリタス (腐食) 食物連鎖とよばれてきた。しかし、デトリタスの栄養価の研究において、例えば海藻の腐植過程で微生物が少ない場合には栄養価 (N, P 量あるいはこれらを餌とする小動物の成長、生残率をもとにして算出) が低いことが明らかにされている (Uchida 等, 1997)。また、マングローブの葉の腐植においても、経時的に炭水化物量が減少し、逆に蛋白質量が增大する。この事象はマングローブ葉の腐植にもなって付着する微生物の量が増加する様相をあらわしており、これら生物遺骸の腐植において、実は付着し増殖する微生物によって全体の栄養価が増大することを意味している。このため、最近ではこれまでのデトリタス食物連鎖や腐食連鎖にかえて“微生物食物連鎖”の用語を用いる場合が多くなった。水産増養殖においても同様に、ケイ藻や緑藻 (ナンノクロロプシス) の生産する有機物等を利用して増殖する微生物、原生動物などの集合体、餌料微生物群集が魚介類幼生の主たる餌料となっている。

#### (b) ケイ藻、ワムシ、大型海藻の増殖促進微生物

有用細菌 (プロバイオティクスやバイオコントロール製剤) の中には、微細藻類 (ケイ藻、緑藻等) の増殖促進作用をあらわす菌株がある。このような菌株を、例えばケイ藻培養に使用した場合には、ケイ藻の増殖促進、及びこのケイ藻と細菌株の混合培養体を投与して飼育するエビ、カニ、貝類などの生残率、成長の向上効果とが同時に得られる。

また、これらの有用細菌の中には大型海藻の生長促進効果をあらわす株がある。海藻と微生物との共生については、微生物の存在により生長が促進される、あるいは生存がより容易となる補完的な関係と、微生物が存在しない条件下では海藻の形態形成が不完全となるといったより密接な相互関係とがあるが、いずれにしても特定の微生物は海藻の生長に影響を及ぼしている。海水中の構造物等の基盤上には微生物が密集して生息していることが知られており、実際に海水中にガラス板を設置した場合には数日後にガラス板は微生物で覆われる。基盤上に付着して生長する海藻は、同様に基盤上に生息する微生物の影響をうけると考えられるが、事実、上記の有用細菌を海藻遊走子の培養系に添加した実験では海藻の生長促進作用がみられた。藻場再生においては、海藻種の生長速度を高め、さらに 1 年生大型海藻を育てて動物の摂食圧を吸収することにより、多年生大型海藻の育成を促進する等の応用技術が必要であるが、上記有用微生物の利用によ

り藻場造成がより進展するものと期待できる。

### (c) 環境向上効果をしめす微生物

上記有用細菌は、有機物などを分解する能力も持つ。養殖場において細菌を配合飼料に混合して魚に投与すると、残餌や糞中の有用細菌が養殖水域の海底土に沈積し、海底土のヘドロを分解する。私達の調査では3ヶ月間の細菌株添加によって、養殖海底土の窒素、隣、硫化物や有機物量が、細菌を添加しなかった場合よりも40~60%減少した。この細菌は海底土中の小動物によっても摂食され、そして増加した動物は海底土中を動き回り土壌粒子を攪拌する。この小動物の攪拌（バイオターベーション）により、酸素量が少ない海底土中に酸素の多い海水が浸透するため、ヘドロの分解がより促進されることになる。

このように、現在私たちが保持している微生物は、複数の生物種に対して効果をあらわす株が多く、例えば海藻生長促進、ケイ藻増殖促進、ワムシや魚介類成長促進等の機能を同時に保持する微生物、魚介類の餌料となり同時に消化管内において病原菌を排除する等の疾病防除効果があり、かつ海底土の有機物を分解して底土環境向上効果をあらわす株等がある。そして、これらの微生物を魚介類残滓の発酵に用いることにより、発酵生産物を飼料に利用できるなどの付加価値が生じるように、これらの微生物利用による相乗効果の発現も期待できる。

### 要約

魚類（イシガキダイ、ホシガレイ、ヒラメ）の生物濾過膜より微生物を分離し、その機能（主として拮抗作用）および同定をおこなった。分離した細菌の中で、約半数の株は病原菌 *Vibrio anguillarum* に対して拮抗作用をしめし、病原菌の増殖を抑制した。また、その大半の菌株は魚類伝染性造血器壊死症原因ウイルス (IHNV) の増殖を抑制した。この結果は、養殖環境においては、病原菌の増殖を抑制する有用細菌が多数生息し、その作用によって疾病防除効果があらわれていることを示唆している。これらの有用細菌は、紫外線滅菌をおこなっている水中では、その菌数は少なく（紫外線滅菌をおこなっていない場合の約1/100）、一方、生物濾過膜などの付着基盤上では増加（紫外線滅菌を行っていない場合の約10倍）する傾向にあった。さらに、病原菌を抑制する菌株は、養殖水中よりも生物濾過膜上において、その出現割合が高く、同様に抗ウイルス細菌の出現割合も生物濾過膜上において高かった。これらの有用細菌の多くは、*Pseudomonas* 属の種と同定された。これらの有用細菌のなかで、魚類（主としてヒラメを使用）の生長促進効果をあらわす菌株を選抜した。

さらに、銅イオンを使用して常時飼育水を滅菌しているヒラメ養殖水環境においては、水中の細菌数は銅イオンを使用していないヒラメ養殖水と比較して、約1/100と低い値を示した。これらの細菌の多くは、魚類の成長阻害作用をあらわす *Flavobacterium* 属



の種であった。また、この銅イオン滅菌を行っている養殖水に上記病原菌に対して拮抗作用をしめし、同時にヒラメの成長促進効果も保持する有用細菌を約1ヶ月間添加したが、その多くは検出できなかったため、銅イオン滅菌環境においてはこれら有用細菌の生存は困難と考えられた。

これら、有用細菌を配合飼料に混合してヒラメに一定期間投与し、その後に病原ウイルス（ビルナウイルス）を注射感染したところ、対照実験区と比較して有用細菌投与区のヒラメの生存率が高かった。

#### 文献

- (1) Austin, B., L. F. Stuckey, P. A. W. Rohertson, I. Effendi, and D. R. W. Griffith. A probiotic strain of *Vibrio alginolyticus* effective in reducing diseases caused by *Aeromonas salmonicida*, *Vibrio anguillarum* and *Vibrio ordalli*. *J. Fish. Dis.*, **18**: 93-96 (1995).
- (2) Bergh, Ø., K. Y. Borsheim, G. Bratbak, and M. Heldal. High abundance of viruses found in aquatic environments. *Nature*, **340**: 467-468 (1989).
- (3) Direkbusarakom, S., M. Yoshimizu, Y. Ezura, L. Ruangpan, and Y. Danayadol. *Vibrio* sp., the dominant flora in shrimp hatchery against some fish pathogenic viruses. *J. Mar. Biotechnol.*, **6**: 266-267 (1998).
- (4) Fauré-Fremiet, E., P. Favard, and N. Carasso. Images électroniques d'une microbiocénose marine. *Cahiers de Biologie Marine*, **4**: 61-64 (1963).
- (5) Fujioka, R. S., P. C. Loh, and L. S. Lau. Survival of human enteroviruses in the Hawaiian Ocean environment: evidence for virus-inactivating microorganisms. *Appl. Environ. Microbiol.*, **6**: 1105-1110 (1980).
- (6) Gatesoupe, F.-J. *Bacillus* sp. spores as food additive for the rotifer *Brachionus plicatilis*: improvement of their bacterial environment and their dietary value for larval turbot, *Scophthalmus maximus* L. pp. 561-568. In: *Fish Nutrition in Practice*. (Kaushik, S. J. and P. Luquet, Eds.). Paris, France: Institut National de la Recherche Agronomique, Les Colloques, Vol. 61 (1991).
- (7) Gerba, C. P., S. M. Goyal, E. M. Smith, and J. L. Melnick. Distribution of viral and bacterial pathogens in a coastal canal community. *Mar. Pollut. Bull.*, **8**: 279-282 (1977).
- (8) Gerba, C. P. and G. E. Schaiberger. Effect of particulates on virus survival in seawater. *J. Water Poll. Contr. Federat.*, **47**: 93-103 (1975).
- (9) Gibson, L. F., J. Woodworth, and A. M. George. Probiotic activity of *Aeromonas media* on the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, when challenged with *Vibrio tubiashii*. *Aquaculture*, **169**: 111-120 (1998).
- (10) Gram, L., J. Melchiorson, B. Spanggaard, I. Huber, and T. F. Nielsen. Inhibition of *Vibrio anguillarum* by *Pseudomonas fluorescens* AH2, a possible probiotic treatment of fish. *Appl. Environ. Microbiol.*, **65**: 969-973 (1999).

- (11) Gundersen, K., Å. Brandeberg, S. Magnusson, and E. Lycke. Characterization of a marine bacterium associated with virus inactivating capacity. *Acta Pathol. Microbiol. Scand. Sect. B: Microbiol.*, **71**: 281-286 (1967).
- (12) Heldal, M. and G. Bratbak. Production and decay of viruses in aquatic environments. *Mar. Eco. Prog. Ser.*, **72**: 205-212 (1991).
- (13) Herrmann, J. E. and D. O. Cliver. Degradation of Coxsackievirus type A9 by proteolytic enzymes. *Infect. Immun.*, **7**: 513-517 (1973).
- (14) Kamei, Y., M. Yoshimizu, Y. Ezura, and T. Kimura. Screening of bacteria with antiviral activity against infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV) from estuarine and marine environments. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **53**: 2179-2185 (1987).
- (15) LaBelle, R. L. and C. P. Gerba. Influence of pH, salinity, and organic matter on the adsorption of enteric viruses to estuarine sediment. *Appl. Environ. Microbiol.*, **38**: 93-101 (1979).
- (16) LaBelle, R. L. and C. P. Gerba. Influence of estuarine sediment on virus survival under field conditions. *Appl. Environ. Microbiol.*, **38**: 749-755 (1980).
- (17) Maeda, M. Microorganisms and protozoa as feed in mariculture. *Prog. Oceanog.*, **21**: 201-206 (1988).
- (18) Maeda, M. *Microbial Processes in Aquaculture*. UK. Biocreate Press, pp. 102 (1999).
- (19) Maeda, M. and I. C. Liao. Effect of bacterial population on the growth of a prawn larva, *Penaeus monodon*. *Bull. Natl. Res. Inst. Aquaculture*, **No. 21**: 25-29 (1992).
- (20) Maeda, M. and I. C. Liao. Microbial processes in aquaculture environment and their importance of increasing crustacean production. *Japan Agr. Res. Quart.*, **28(4)**: 283-288 (1994).
- (21) Maeda, M. and K. Nogami. Some aspects of the biocontrolling method in aquaculture. pp. 395-398. In: *Current Topics in Marine Biotechnology*. (Miyachi, S., et al., Eds.). Tokyo: Japan. Soc. Mar. Biotechnol. (1989).
- (22) Maeda, M., Nogami, K., Kanematsu, M. and Hirayama, K. The concept of biological control methods in aquaculture. *Hydrobiol.*, **358**: 285-290 (1997).
- (23) Maeda, M., K. Nogami, and N. Ishibashi. Utility of microbial food assemblages for culturing a crab, *Portunus trituberculatus*. *Bull. Natl. Res. Inst. Aquaculture*, **No. 21**: 31-38 (1992).
- (24) Magnusson, S., K. Gundersen, Å. Brandberg, and E. Lycke. Marine bacteria and their possible relation to the virus inactivation capacity of sea water. *Acta Pathol. Microbiol. Scand. Sect. B: Microbiol.*, **71**: 274-280 (1967).
- (25) Matossian, A. M. and G. A. Garabedian. Virucidal action of sea water. *Amer. J. Epidemiol.*, **85**: 1-8 (1967).
- (26) Metcalf, T. G. and W. C. Stiles. The accumulation of enteric viruses by oyster *Crassostrea*

- virginica*. *J. Infec. Dis.*, **115**: 68-76 (1965).
- (27) Munro, P. D., A. Barbour, and T. H. Birkbeck. Comparison of the growth and survival of larval turbot in the absence of culturable bacteria with those in the presence of *Vibrio anguillarum*, *Vibrio alginolyticus*, or a marine *Aeromonas* sp. *Appl. Environ. Microbiol.*, **61**: 4425-4428 (1995).
- (28) Nikoskelainen, S., A. Ouwehand, S. Salminen, and G. Bylund. Protection of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) from furunculosis by *Lactobacillus rhamnosus*. *Aquaculture*, **198**: 229-236 (2001).
- (29) Nogami, K., K. Hamasaki, M. Maeda, and K. Hirayama. Biocontrol method in aquaculture for rearing the swimming crab larvae *Portunus trituberculatus*. *Hydrobiol.*, **358**: 291-295 (1997).
- (30) Nogami, K. and M. Maeda. Bacteria as biocontrol agents for rearing larvae of the crab *Portunus trituberculatus*. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, **49**: 2373-2376 (1992).
- (31) Okuzumi, M, S. Okuda, M. Awano. Isolation of psychrophilic and halophilic histamine-forming bacteria from *Scomber japonicus*. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries*. **47**(12): 1591-1598 (1981).
- (32) Porter, K. G., and Y. G. Feig. The use of DAPI for identifying and counting aquatic microflora *Limnol. Oceanogr.* **25**: 943-948 (1980).
- (33) Riquelme, C., G. Hayashida, R. Araya, A. Uchida, M. Satomi, and Y. Ishida. Isolation of a native bacterial strain from the scallop *Argopecten purpuratus* with inhibitory effects against pathogenic vibrios. *J. Shellfish Res.*, **15**: 369-374 (1996).
- (34) Robertson, P., O' C. Dowd, C. Burrells, P. Williams, and B. Austin. Use of *Carnobacterium* sp. as a probiotic for Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum). *Aquaculture*, **185**: 235-243 (2000).
- (35) Smith, E. M., C. P. Gerba, and J. J. Melnick. Role of sediment of the persistence of enteroviruses in the estuarine environment. *Appl. Environ. Microbiol.*, **35**: 685-694. (1978)
- (36) Steward, G. F., D. C. Smith, and F. Azam. Abundance and production of bacteria and viruses in the Bering and Chukchi Seas. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, **131**: 287-300 (1996).
- (37) Suttle, C. A. and F. Chen. Mechanisms and rates of decay of marine viruses in seawater. *Appl. Environ. Microbiol.*, **58**: 3721-3729 (1992).
- (38) Toranzo, A. E., J. L. Barja, and F. M. Hetrick. Antiviral activity of antibiotic-producing marine bacteria. *Can. J. Microbiol.*, **28**: 231-238 (1982).
- (39) Toranzo, A. E., J. L. Barja, and F. M. Hetrick. Mechanism of poliovirus inactivation by cell-free filtrates of marine bacteria. *Can. J. Microbiol.*, **29**: 1481-1486 (1983a).
- (40) Toranzo, A. E., J. L. Barja, M. L. Lemos, and F. M. Hetrick. Stability of infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) in untreated, filtered and autoclaved estuarine water. *Bull. Eur. Ass. Fish. Pathol.*, **3**: 51-53 (1983b).

- (41) Toranzo, A. E. and F. M. Hetrick. Comparative stability of two salmonid viruses and poliovirus in fresh, estuarine and marine waters. *J. Fish. Dis.*, **5**: 223-231 (1982).
- (42) Uchida, M., K. Nakata, and M. Maeda. Introduction of detrital food webs into an aquaculture system by supplying single cell algal detritus produced from *Laminaria japonica* as a hatchery diet for *Artemia nauplii*. *Aquaculture*, **154**: 125-137 (1997).
- (43) Weinbauer, M. G., D. Fuks, S. Puskaric, and P. Peduzzi. Diel, seasonal, and depth-related variability of viruses and dissolved DNA in the Northern Adriatic Sea. *Microb. Ecol.*, **30**: 25-41 (1995).
- (44) Williams, P. J. leB. Incorporation of microheterotrophic processes into the classical paradigm of the planktonic food web. *Kieler Meeresforsch. Sonderheft*, **5**: 1-28 (1981).
- (45) Yoshimizu, M. and Y. Ezura. Biological control of fish virus diseases by anti-virus substance producing bacteria (in Japanese with English abstracts). *Microb. Environ.*, **14**: 269-275 (1999).
- (46) ZoBell, C. E. *Marine Microbiology*. Chronica Botanica Co., Waltham, 240pp (1946).

表 1. イシガキダイ飼育水からの分離菌株における抗 *Vibrio* 活性と簡易分類

Bacterial strains *	Vibrio-static activities (%)*	Motility	Cytochrome oxidase test	O-F test	Tentative identification
OP-1	39	-	+	negative	not identified
OP-2	29	+	+	negative	<i>Pseudomonas III/IV</i>
OP-3	17	+	-	negative	not identified
OP-4	29	-	-	negative	<i>Flavobacterium</i>
OP-5	29	-	-	negative	<i>Flavobacterium</i>
OP-6	36	+	-	negative	not identified
OP-7	29	+	+	negative	<i>Pseudomonas III/IV</i>
OP-8	39	+	+	Oxidative	<i>Pseudomonas I·II</i>
OP-9	32	-	-	negative	not identified
PB-1	55	-	-	negative	<i>Flavobacterium</i>
PB-2	50	-	-	negative	<i>Flavobacterium</i>
PB-3	67	-	-	negative	<i>Flavobacterium</i>
PB-4	52	-	-	negative	<i>Flavobacterium</i>
PB-5	53	-	+	negative	not identified
PB-6	50	+	+	Oxidative	<i>Pseudomonas I</i>
PB-7	33	-	-	negative	<i>Flavobacterium</i>
SKW-1	53	+	+	Oxidative	<i>Pseudomonas I·II</i>
SKW-2	22	+	+	negative	<i>Pseudomonas III/IV</i>
SKW-3	9	+	-	negative	not identified
SKW-4	47	+	+	Fementative	<i>Vibrio</i>
SKW-5	14	+	-	negative	not identified
SKW-6	29	+	+	Fementative	<i>Vibrio</i>

\*:OP:イシガキダイ水槽中のスライドガラス付着細菌.

PB: イシガキダイ水槽中の生物濾過材からの付着細菌.

SKW: イシガキダイ飼育水中からの分離細菌.

\*\* :抗 *Vibrio* 活性試験には病原菌 *Vibrio anguillarum* を用いた.

表 2. ヒラメ、ホシガレイ 飼育水からの分離菌株における抗 *Vibrio* 活性と簡易分類

Bacterial strains*	Vibrio-static activities (%)	Motility	Cytochrome oxidase test	O-F test	Tentative identification
PO-1	33	+	+	negative	<i>Pseudomonas III/IV</i>
PO-2	0	+	+	Oxidative	<i>Pseudomonas I-II</i>
PO-3	25	+	+	negative	<i>Pseudomonas III/IV</i>
PO-4	22	+	-	negative	not identified
PO-5	0	+	+	negative	<i>Pseudomonas III/IV</i>
PO-6	0	-	-	negative	<i>Flavobacterium</i>
PO-7	22	-	-	negative	<i>Flavobacterium</i>
PO-8	0	-	-	Oxidative	<i>Pseudomonas I-II</i>
PO-9	54	+	+	Fermentative	<i>Vibrio</i>
Net-1	44	+	+	negative	<i>Pseudomonas III/IV</i>
Net-2	36	+	+	Oxidative	<i>Pseudomonas I-II</i>
Net-3	43	+	+	Oxidative	<i>Pseudomonas I-II</i>
Net-4	12	-	-	negative	<i>Flavobacterium</i>
Net-5	19	+	+	Oxidative	<i>Pseudomonas I-II</i>
POW-1	30	+	+	negative	<i>Pseudomonas III/IV</i>
POW-2	0	-	-	negative	<i>Flavobacterium</i>
VV-1	1	+	+	negative	<i>Pseudomonas III/IV</i>
VV-2	0	+	-	negative	not identified
VV-3	25	+	+	negative	<i>Pseudomonas III/IV</i>
VV-4	1	-	-	negative	<i>Flavobacterium</i>
VV-5	20	+	+	negative	<i>Pseudomonas III/IV</i>
VV-6	36	+	+	negative	<i>Pseudomonas III/IV</i>
VV-7	43	+	+	negative	<i>Pseudomonas III/IV</i>
FS-1	39	+	+	Oxidative	<i>Pseudomonas I-II</i>
FS-2	33	+	+	negative	<i>Pseudomonas III/IV</i>
FS-3	21		-	negative	<i>Flavobacterium</i>
FS-4	33	+	+	Oxidative	<i>Pseudomonas I-II</i>
FS-5	36	-	-	negative	<i>Flavobacterium</i>
FS-6	0	+	+	Oxidative	<i>Pseudomonas I-II</i>
VVW-1	0	-	-	negative	<i>Flavobacterium</i>
VVW-2	48	+	+	Fermentative	<i>Vibrio</i>

\*:PO:ヒラメ水槽中のスライドガラス付着細菌, Net:ヒラメ水槽中の生物濾過材付着細菌.

POW:ヒラメ飼育水中からの分離細菌.

VV:ホシガレイ水槽中のスライドガラス付着細菌, FS: ホシガレイ水槽中濾過砂付着細菌, VVW: ホシガレイ飼育水中からの分離細菌.

表 3. 異なった分離源(イシガキダイ、ヒラメ及びホシガレイ飼育槽)から採取した菌株中の  
抗菌性細菌数

	Number of strains isolated*	Number of <i>vibrio-static</i> bacteria	Number of virucidal bacteria**
Isolated bacteria from glass slide	25	8	2
Isolated bacteria from biofilter	18	14	3
Isolated bacteria from aquaculture wa	10	4	0

\*:抗 *Vibrio* 活性が 30%以上の菌株数.

\*\* :抗 *Vibrio* 活性を保持する菌株における抗ウイルス活性を保持する細菌数.

表 4. 抗ウイルス活性の強い菌株における抗エドワジェラ活性

Bacterial strains	<i>Vibrio</i> -static activities(%)	<i>E. tarda</i> -static activities(%)
OP-1	39	<b>35</b>
OP-6	36	<b>21</b>
OP-8	39	0
OP-9	32	9
PB-3	67	0
PB-5	53	0
PB-6	50	0
PB-7	33	0
PO-1	33	0
Net-1	44	0
Net-3	43	0

表 5. 銅イオン滅菌水槽から分離した細菌群の銅耐性菌の割合と簡易分類

Bacterial strains	Source of isolation	Cu Cl <sub>2</sub> concentrations (ppm)							
		0	0.01	0.1	1	10	50	100	250
POCW-1	water	+	-	-	-	-	-	-	-
POCW-2	water	+	-	-	-	-	-	-	-
POCW-3	water	+	+	+	+	+	+	+	-
POCW-4	water	+	+	+	+	+	+	+	-
POCW-5	water	+	-	-	-	-	-	-	-
POCW-6	water	+	+	+	+	+	+	+	-
POCW-7	water	+	+	+	+	+	+	+	-
POCW-8	water	+	+	+	+	+	-	-	-
POCW-9	water	+	+	+	+	+	-	-	-
POCD-1	intestinal	+	+	+	+	+	-	-	-
POCD-2	intestinal	+	+	+	+	-	-	-	-
POCD-3	intestinal	+	+	+	+	+	+	+	-
POCD-4	intestinal	+	+	+	+	+	+	+	-
POCD-5	intestinal	+	+	+	+	+	+	-	-
	<i>Ecklonia kurome</i>								
EKZ-2	zoospores	+	+	+	+	-	-	-	-
OL-4	<i>Oryzias latipes</i> water	+	-	-	-	-	-	-	-

POCW: 銅イオン滅菌水中分離菌株, POCD:銅イオン滅菌水で飼育したヒラメ腸内細菌.

EKZ-2: 海藻クロメ遊走子から分離した有用細菌.

OL-4: メダカ飼育水中から分離した有用細菌.

表 6. 細菌を加えた餌を投与した各個体の食食作用

	個体番号				
	1	2	3	4	5
対照	8	12	7	16	20
細菌 A	21	17	22	28	23

表 7. 各飼料を投与した後、溶血連鎖球菌感染後の各区の斃死数

処理	斃死数
対照	9 / 15
細菌 A	4 / 15

表 8. ウイルス注射感染後のヒラメ斃死個体数

対照	2 / 10
細菌 A	0 / 10
細菌 B	0 / 10

表 9. 注射感染後の生残魚のウイルス分離率

ウイルス分離率	
対照	4 / 8
細菌 A	3 / 10
細菌 B	2 / 10

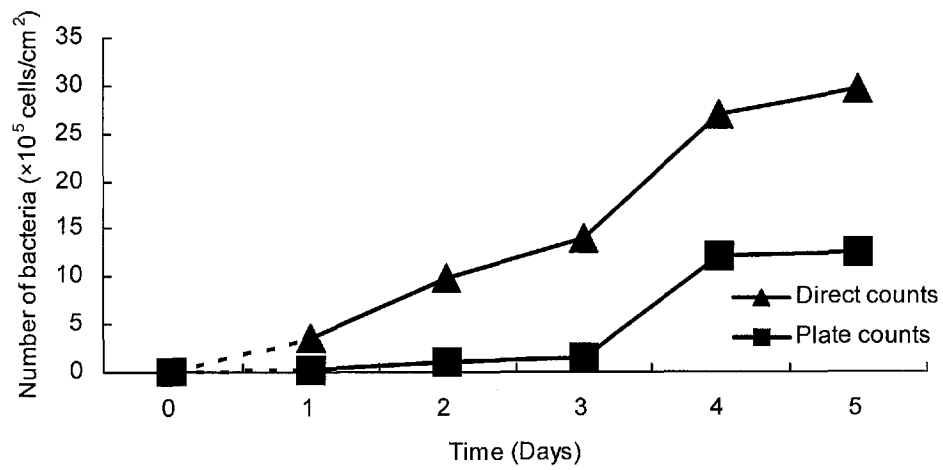


図1. 直接計数法と平板法によるイシガキダイ水槽に設置したスライドガラス上の付着細菌数の変化.



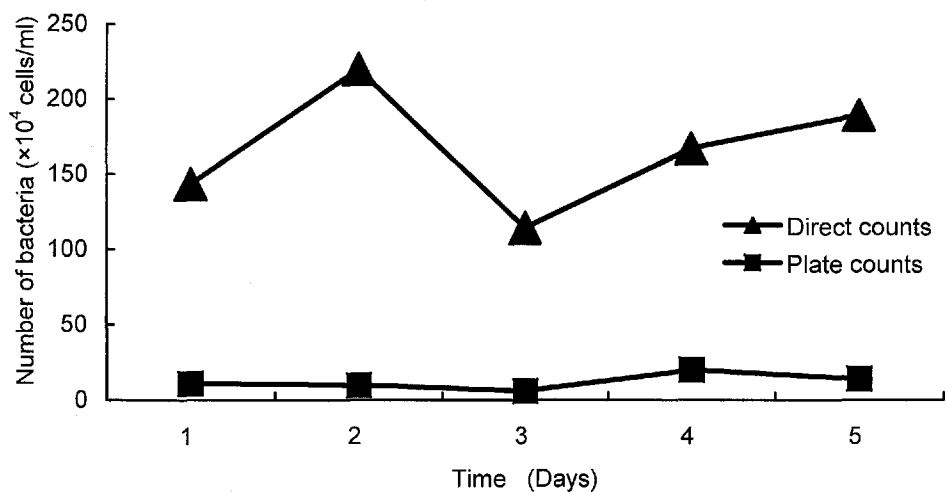


図2. 直接計数法と平板法によるイシガキダイ飼育水中の細菌数の変化.

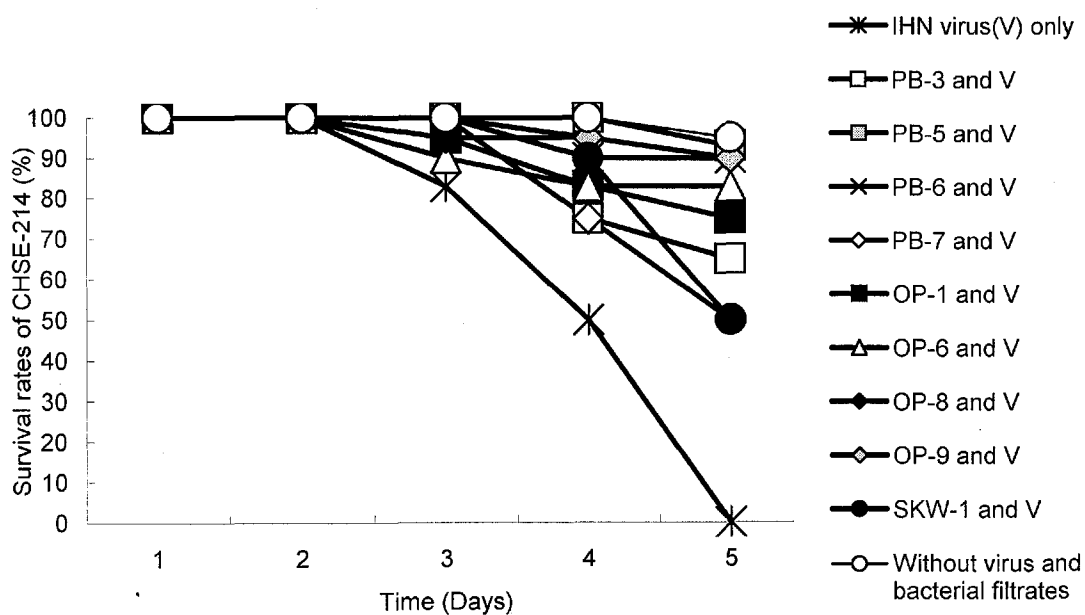


図3. イシガキダイ飼育水槽からの分離菌株上澄液によるIHNウイルス成長抑制効果.

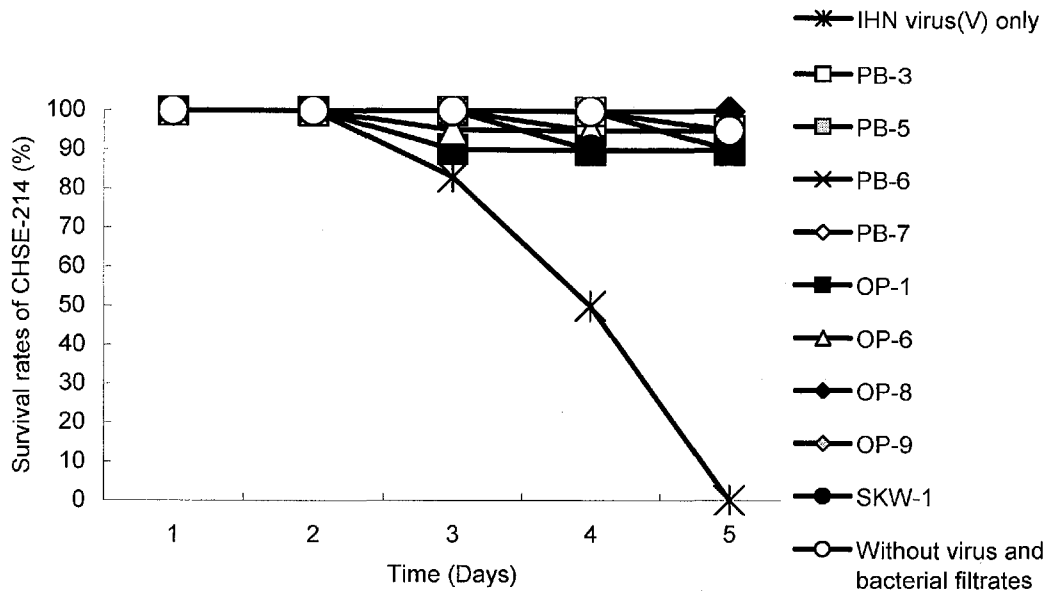


図4. イシガキダイ飼育水槽からの分離菌株上澄液によるCHSE-214細胞変性効果.

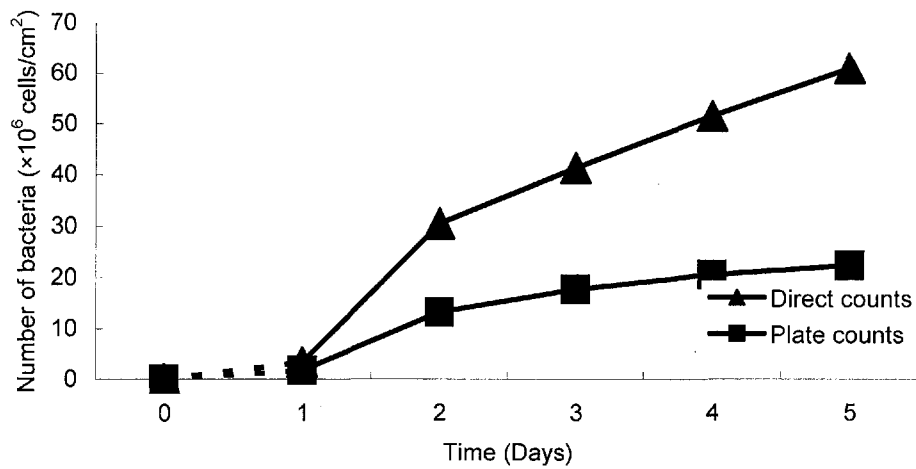


図5. 直接計数法と平板法によるヒラメ水槽に設置したスライドガラス上の付着細菌数の変化.

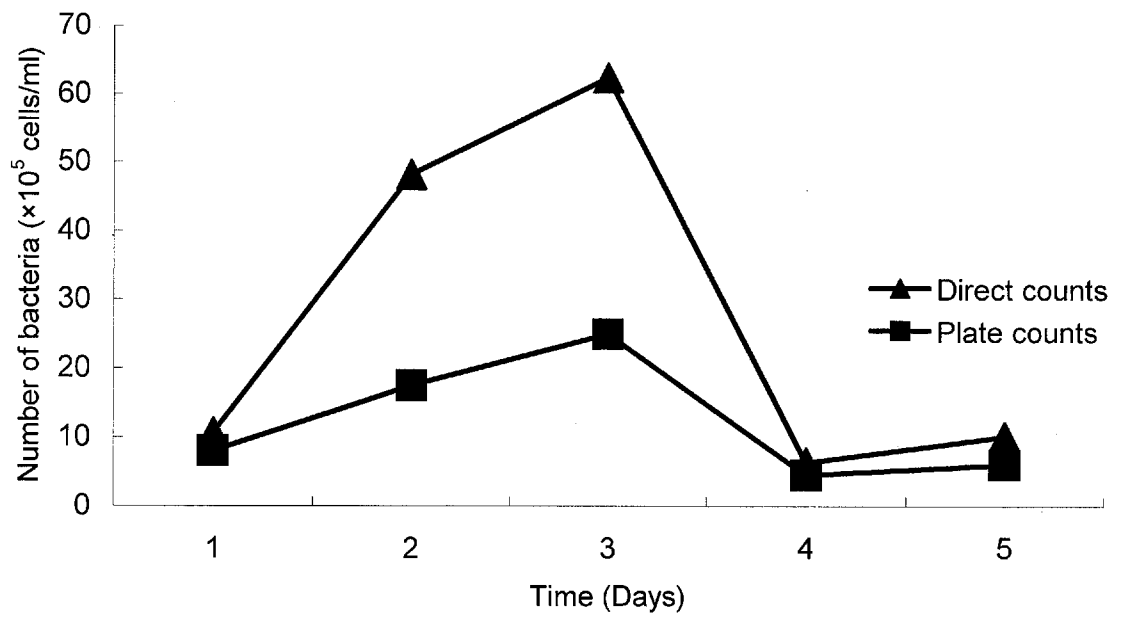


図6. 直接計数法と平板法によるヒラメ飼育水中の細菌数の変化.

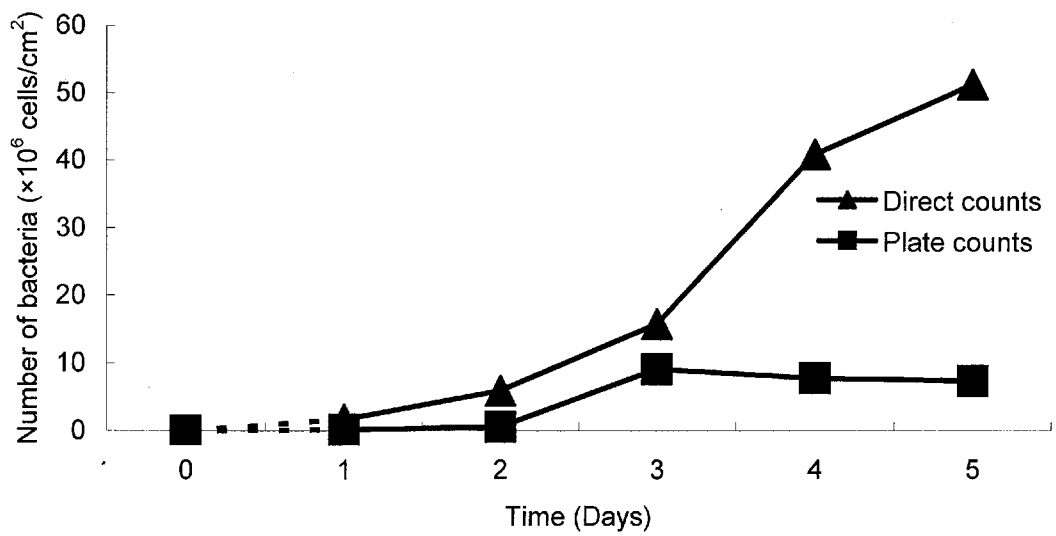


図7. 直接計数法と平板法によるホシガレイ水槽に設置したスライドガラス上の付着細菌数の変化.

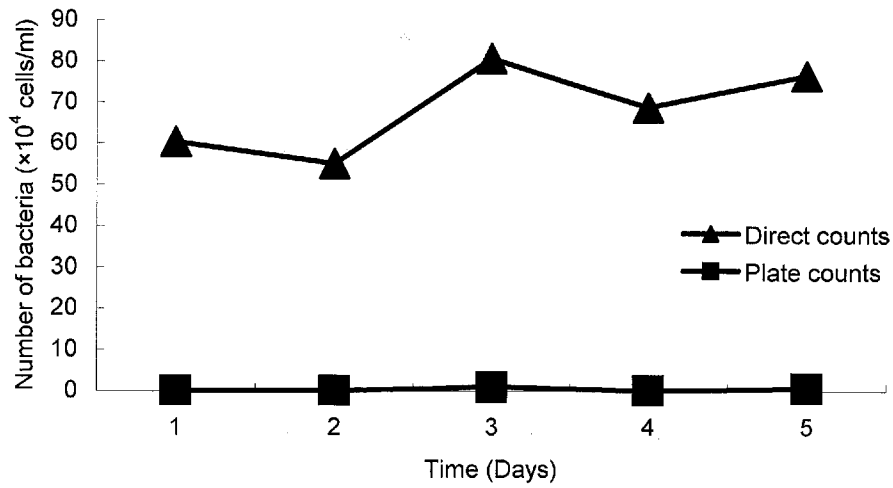


図8. 直接計数法と平板法によるホシガレイ飼育水中の細菌数の変化.

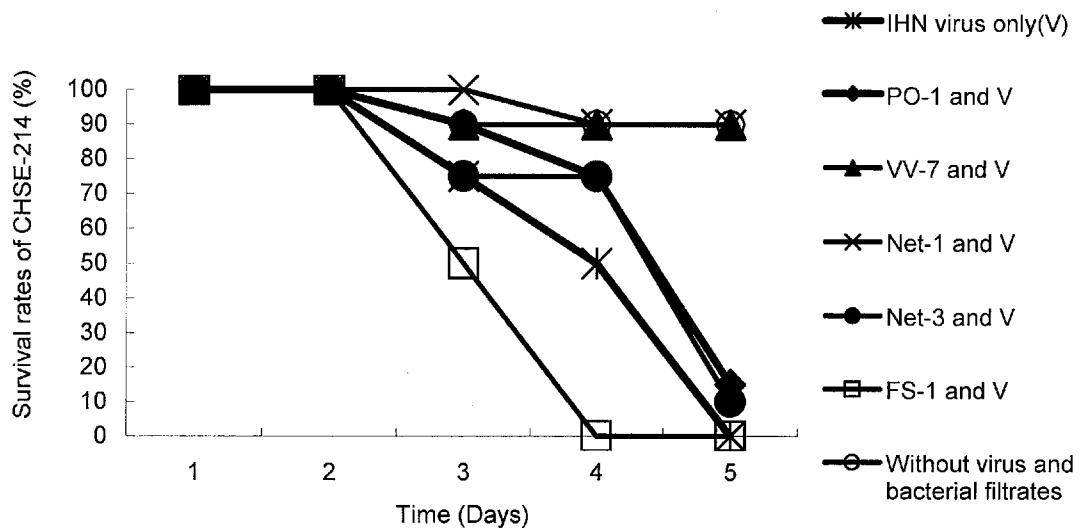


図9. ヒラメ、ホシガレイ飼育水槽からの分離菌株上澄液によるIHNウイルス成長抑制効果.

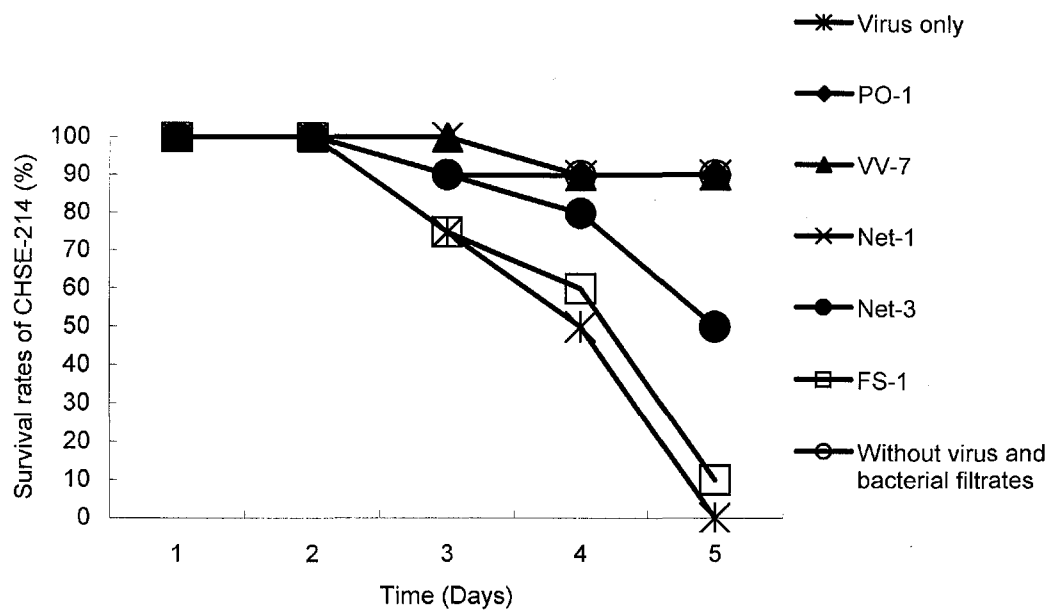


図10. ヒラメ、ホシガレイ飼育水槽からの分離菌株上澄液によるCHSE-214細胞変性効果.