

## 学 位 論 文 要 旨

氏 名	野口 浩介
題 目	増養殖環境における微生物の生態と利用に関する研究 (Ecology of microorganisms and their use in the aquaculture environment)

本研究は、抗ウイルス・抗病原性細菌の機能を持つ拮抗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方法の確立を目的としている。このため、養殖環境から、拮抗細菌の探索を行った。この探索において、養殖水および付着基盤（スライドガラス及び生物濾過材）から分離した菌株のうち、約半数は抗 *Vibrio* 活性を保持していたが、抗 *Edwardsiella* 試験では抗菌活性を保持する菌株数は少なかった。また抗ウイルス試験において、付着基盤からの分離細菌 6 株が強い抗ウイルス活性を示した。

次に、分離した拮抗細菌 LMC-9 株を配合飼料に混合し、本飼料を投与した細菌投与区と無投与の対照区とを設定し、マダイエドワジエラ症感染防除実験を行った。この結果、細菌投与区において疾病防除効果がみられた。また、拮抗細菌投与により、マダイ好中球の食食率と食食指数には、対照区と比較して有意な差はみられなかったが、好中球数は対照区より約 6 倍多く、マダイ生体防御能の向上が明らかとなった。

ヒラメ飼育水槽において、付着基盤としての海藻表面より分離した拮抗細菌 EKZ-2 株を投与した実験区と無投与の対照区とを設定し、水中細菌相とヒラメの成長とを比較した結果、水中細菌相では細菌投与区から優占して EKZ-2 株が分離され、ヒラメの体重も対照区よりも有意に増加した。また、ヒラメ種苗生産(約 50 万尾)において、細菌投与区では 41 万尾が生残したのに対して、対照区では約 9 万尾が生残し、細菌投与の効果が示された。

次に、銅イオン滅菌装置を使用しているヒラメ養殖場において、生菌数と細菌相をしらべた。生菌数は通常の養殖水と比較して少なく、細菌相では色素産生細菌(*Flavobacterium* 属)及び *Vibrio* 属の種が優占する傾向にあり、通常みられる *Pseudomonas* 属の菌は顕著に減少していた。また、拮抗細菌 EKZ-2 株を銅イオン添加培地に移植したところ、その増殖は阻害された。

さらに、EKZ-2 株を使用して、ウナギエドワジエラ症感染防除実験を行った結果、細菌投与区では死亡率が 0%であったのに対して、対照区では 73%となり、疾病防除効果がみられた。また、養鰻池現場(約 20,000 尾/池を飼育)において細菌投与を行った結果、細菌投与区では約 500 尾の減耗に対して、対照生産区では約 3,500 尾が斃死した。

養鰻池における拮抗細菌 PMC-7 株投与実験においては、菌株無投与区において養殖水中、底層土及びウナギ体中から、菌投与区と比較して大幅に多い数の病原菌 *Edwardsiella tarda* が検出された。すなわち細菌投与区では *E. tarda* 検出率が 18.9%であったのに対して、対照生産区では 56.8%であった。また、細菌投与区及び対照区における、栄養塩濃度の変動、およびウナギ斃死数を比較した結果、栄養塩の測定では、細菌投与区において、その濃度の減少することが判明し、さらに、ウナギ生残率も向上した。

以上、本研究をとおして次のことが明らかになった。①有用細菌の投与により病原菌が抑制された。②有用細菌を飼料とした場合、魚類の免疫機能が向上した。③有用菌の利用において、養殖魚の成長促進、生残率の向上効果があらわれた。④有用細菌の投与により栄養塩の減少、すなわち養殖環境の向上効果があらわれた。

## 学 位 論 文 要 旨

氏 名	Kohsuke Noguchi
題 目	Ecology of microorganisms and their use in the aquaculture environment (増養殖環境における微生物の生態と利用に関する研究)

In order to prevent the multiplication of viruses and bacterial pathogens which infect to fish, the research of the function of antagonistic influences among microorganisms in aquaculture should be useful. For this purpose, marine and fresh water bacteria that have the properties of virusidal and bacteria-static activities in the aquaculture site was investigated. Firstly the microbes which attached to the several substrates in aquaculture environments were isolated. The strains that maintained the bacteria-static activities were few in the anti-*Edwardsiella* though half the number had the anti-*Vibrio* activities among the strains that isolated aquaculture water, the glass slide, and the biofilm set to the fish-rearing container. After this study several bacterial strains were obtained that keep virusidal and *Vibrio*-static activities and were used for the following studies.

In the study of antagonistic bacterium, the process of microbial interactions was used for prevention of red sea bream diseases. As a result, *Edwardsiella tarda* infecting to red sea bream was restrained using bacteria LMC-9 strain given as a feed to fish. In addition, the number of neutrophil increased six times more compared with LMC-9 strain with the fish without LMC-9.

The EKZ-2 strain isolated from the macroalgae *Ecklonia kurome* zoospore, which has the anti-bacterial activities for pathogenic *Vibrio anguillarum* and *E. tarda* was used for rearing flat-fish. The increased body weight of flat fish juvenile was obtained using the EKZ-2 strain, and also *in situ*, the survival rates of flat fish was much improved in the mass production of the larvae with EKZ-2.

Number of bacteria decreased in copper sterilized water compared in usual aquaculture water, and *Flavobacterium* and *Vibrio* were dominating in water where copper was used. Moreover, when the EKZ-2 strain was inoculated in the low concentration copper medium, the growth was inhibited.

The mortality rate became 73% without EKZ-2 strain while it was 0% with EKZ-2 strain as a result of the *Edwardsiella* syndrome infection in eel aquaculture.

Also in eel aquaculture *in situ*, the presence of *E. tarda* was checked in rearing water, soil of the bottom in the ponds and the bodies of eel using PCR. As a result, The *E. tarda* detection rates were 56.8% without the PMC-7 strain, while with PMC-7 was 18.9% in aquaculture water. Moreover, the change of the density of the nutritive salts in the aquaculture environment was verified with and without PMC-7. It was confirmed that the concentration of nutritive salts decreased with PMC-7. And, the survival number of the eel was much higher using PMC-7 than that without PMC-7.

With the studies of these microorganisms and their use *in vitro* and *in situ*, several results were obtained; that is, ① the pathogenic microbes were depressed, ② the immune activities were increased with these microorganisms, ③ the survival and production rates of aquaculture fish were improved, and ④ nutrients concentration in fish rearing biotopes decreased using the microbes as a feed to fish.

学位論文審査結果の要旨	
学位申請者 氏 名	野口 浩介
審査委員	主査 宮崎大学 前田 昌調
	副査 宮崎大学 岩槻 幸雄
	副査 佐賀大学 神田 康三
	副査 鹿児島大学 川村 軍蔵
	副査 鹿児島大学 山本 淳
審査協力者	
題 目	増養殖環境における微生物の生態と利用に関する研究 (Ecological studies on microorganisms and their use in the aquaculture environment)
<p>本研究は、抗ウイルス・抗病原細菌能を保持する拮抗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方法の確立を目的としている。そこで、養殖環境から、拮抗細菌の探索を行った。この探索において、養殖水、スライドガラス表面及び生物濾過材表面から分離した菌株のうち、約半数は抗 <i>Vibrio</i> 活性を保持していたが、抗 <i>Edwardsiella</i> 試験では、抗菌活性を保持する菌株は少なかった。また抗ウイルス試験において、付着基盤からの分離細菌 6 株が強い抗ウイルス活性を示した。</p> <p>次に、分離した拮抗細菌 LMC-9 株を配合飼料に混合し投与した細菌投与区と、無投与の対照区とを設定し、マダイエドワジエラ症感染防除実験を行った結果、細菌投与区において疾病防除効果がみられた。また、拮抗細菌投与により、マダイ好中球の食食率、食食指数には対照区と比較して有意な差はみられなかったが、好中球数が対照区より 6 倍多い結果となり、マダイ生体防御能の向上が明らかとなった。</p> <p>ヒラメ飼育水槽において、海藻表面より分離した拮抗細菌 EKZ-2 株を投与した区と無投与の対照区とを設定し、水中細菌相とヒラメの成長を比較した結果、水中細菌相では細菌投与区から優占して EKZ-2 株が分離され、ヒラメの体重も対照区より有意に増加した。また、ヒ</p>	

ラメ種苗生産(約 50 万尾)において、細菌投与区では 41 万尾が生残したのに対して、対照区では約 9 万尾のみが生残し、細菌投与の効果が示された。また、細菌投与区の水中からは、EKZ-2 株が優占して分離された。

次に、銅イオン滅菌を使用し、魚体の減耗が顕著なヒラメ養殖場において、生菌数と細菌相を調査した。生菌数は通常の養殖水と比較して減少しており、細菌相では色素産生細菌 (*Flavobacterium* 属) 及び *Vibrio* 属の種が優占し、通常の養殖水の細菌相とは異なっていた。また、拮抗細菌 EKZ-2 株を銅イオン添加培地に移植したところ、その増殖は阻害された。

さらに、EKZ-2 株を使用して、ウナギエドワジエラ症感染防除実験を行った結果、細菌投与区では死亡率が 0%であったのに対して、無投与の対照区では 73%となり、疾病防除において有意な差が見られた。そこで、養鰻池現場において細菌投与を 2 年間行った結果、平均して細菌投与区では約 500 尾/池が斃死したのに対して、対照生産区では約 3500 尾/池が斃死した。

養鰻池における拮抗細菌 PMC-7 株投与実験において、細菌投与区及び無投与の対照生産区での病原菌 *Edwardsiella tarda* の出現率、栄養塩濃度の変動、およびウナギ斃死数を比較した結果、細菌投与区養殖水中では *E. tarda* 検出率が 18.9%であったのに対して、対照生産区では 56.8%であった。そして、栄養塩の測定では、細菌投与によって、その濃度の減少することが確認され、また、拮抗細菌投与によりウナギ生残率が向上した。

以上、本研究をとおして、拮抗細菌による養殖魚の疾病防除、及び代謝・成長促進の可能性が強く示唆された。

最終試験結果の要旨	
学位申請者 氏名	野口 浩介
審査委員	主査 宮崎大学 前田 昌調
	副査 宮崎大学 岩槻 幸雄
	副査 佐賀大学 神田 康三
	副査 鹿児島大学 川村 軍蔵
	副査 鹿児島大学 山本 淳
審査協力者	
実施年月日	平成22年 1月15日
試験方法 (該当のものを○で囲むこと。) <span style="float: right;">○口答・筆答</span>	
<p>主査及び副査は、平成22年 1月15日の公開審査会において学位申請者に対して、学位申請論文の内容について説明を求め、関連事項について試問を行った。具体的には別紙のような質疑応答がなされ、いずれも満足できる回答を得ることができた。</p> <p>以上の結果から、審査委員会は申請者が博士(農学)の学位を受けるに必要な十分の学力ならびに識見を有すると認めた。</p>	

学位申請者 氏名	野口浩介
-------------	------

〔質問1〕山本淳→好中球は、魚体浮袋では活性化したものが多いため、抹消血から採取した方がよい。

〔回答〕活性化した好中球の計数を目的としたため、このような採取方法となった。

〔感想〕山本淳→養鰻池でエドワジエラが拮抗細菌で抑制されたデータは、有意義である。

〔質問2〕神田康三→ZoBell2216E培地は海洋細菌用で、淡水菌は増殖しないのではないか。

〔回答〕ZoBell2216E培地において、塩分を低濃度として淡水産細菌の分離に対応した。ご指摘に添い、改変ZoBell培地と表記する。

〔質問3〕川村軍蔵→現場の研究が多いので無理かもしれないが、繰り返しの実験を試行できなかったか。

〔回答〕現場実験では、大規模養殖場を使用したため、養殖魚に斃死などの問題が起きないように、短期間の予備実験を何度か繰り返し、投与する有用細菌に問題がないか検証した。その後、魚類の疾病防除、成長促進、あるいは養殖水の水質向上効果の検証を行ったため、再現性のあるデータが取得できたものとする。

〔質問4〕→現場実験において養殖場を選択する際に、業績のよい場所と悪い場所との両者を選定し、その間の比較データをとるようにしたのか。

〔回答〕養鰻場、およびヒラメ養殖場では、高い頻度で疾病が発生していたため、そのような現場の設定が可能であった。そして、例えば養鰻場での研究では、疾病の多い池からは病原菌エドワジエラが多く検出され、成績のよい池では、その出現率が低いといった結果も得た。

その他、現場実験が多いこと、また、現場での養殖魚生産において好成績をあげたことにお褒めのことばをいただいた。さらに、佐賀県水産振興センターにて業務を行い、業務後に博士論文を執筆した労へのねぎらいの言葉もいただいた。

以上のことから、回答は適切であったと考えられる。