

好適環境水利用時の細菌叢の変化

Alteration of the bacterial flora in The Third Water

中山 美月・福井 貴史・小林 照幸

Mizuki NAKAYAMA, Takashi FUKUI and Teruyuki KOBAYASHI

好適環境水は基本的に塩化ナトリウム、塩化カルシウム、塩化カリウムの3種を溶解した水である。飼育魚の成長が早くなる、人工海水に比べ低コストで済む魚病発生が抑えられるなどのメリットがあるが、好適環境水に関わる細菌の報告はほとんど見られない。

本研究では各地から採取した細菌を好適環境水で培養し、培養前後の細菌叢を比較することにより、種々の細菌に及ぼす好適環境水の影響を調べた。好適環境水で培養した場合、その影響は採取地により異なっていたが、培養前後をそれぞれ一まとまりの培地として比較した場合、*Rhodobacteraceae* 科、*Flavobacteriaceae* 科の細菌群が培養後に減少しており、*Exiguobacterium* 属、*Photobacterium* 属の細菌が増加していた。培養後には属および種の総数も減少していた。これらの結果から好適環境水は明らかに細菌の増殖に影響を与え、特定の細菌に対して選択的に作用しているということが示された。

1. はじめに

好適環境水は魚類の正常な代謝を維持するために最小限必要な電解質を溶解した水である¹⁾。海水はおよそ60種類のイオンを含んでいるが、好適環境水は基本的に塩化ナトリウム、塩化カルシウム、塩化カリウムの3種を使い塩分濃度が海水の約4分の1程度に調整されている。この塩分濃度は淡水魚、海水魚の体液と同一の濃度（浸透圧）であるため、同じ水で共に育てることも可能であり、魚類の浸透圧におけるエネルギー消費を抑えられる。これは餌料から得たエネルギーを成長に利用できるということであり、実際にトラフグやヒラメでは人工海水で飼育した場合より成長が早くなることが分かっている。

海面養殖には養殖適地の制約及び季節・天候・災害の影響などの問題がある。陸上養殖は施設の初期投資、電気代、海水代などコスト面の課題があるが、特に閉鎖循

環式の養殖は、飼育環境の管理、少ない場所の制約、外部環境への影響の軽減などのメリットにより注目されている。更に、閉鎖循環式の養殖において好適環境水を使用した場合、人工海水に比べ低コストで済むというメリットだけではなく、浸透圧の問題から魚病の原因細菌の活性が抑制され、抗生物質などの投薬が不要というメリットもある。人工海水、好適環境水どちらを使用した場合でも閉鎖循環式陸上養殖において問題となるのは飼育する魚から排泄されるアンモニアである。アンモニアは魚にとって有毒であるが環境中であれば通常2群の硝化細菌（アンモニアから亜硝酸および亜硝酸から硝酸への酸化）により最終的に硝酸塩にまで酸化される。更に条件によっては硝酸塩から窒素ガスへの脱窒が行われる。このように好適環境水を用いた閉鎖循環式陸上養殖において細菌は非常に深く関わっているにもかかわらず、好適環境水に関わる細菌の報告はほとんど見られない。

本研究では各地から海水、淡水を採取し、これらに含まれる細菌を好適環境水で培養した。培養前後の細菌叢を比較することにより、種々の細菌に及ぼす好適環境水の影響を明らかにすることを目的とした。

連絡先：小林照幸 tkobayashi@cis.ac.jp

千葉科学大学大学院薬学研究所

Graduate School of Pharmacy, Chiba Institute of Science
Graduate School

(2018年10月2日受付, 2018年12月25日受理)

2. 実験方法

2. 1 試料の調整

千葉県銚子市内の4ヶ所から海水および淡水を採取した(図1)。それぞれの試料名と採取地の緯度、経度は次の通りである。銚子マリーナ海水浴場付: SW1 (35°42'30.6"N 140°50'14.4"E), 外川港: SW2 (35°41'44.5"N 140°51'21.9"E), 銚子市高神東町・小畑池: R1 (35°47'52.2"N 140°43'22.7"E), 銚子市櫻井町公園付近・利根川: R2 (35°42'35.5"N 140°51'29.3"E)。採取した試料100mlをろ紙を3枚重ねて濾過した後、濾液を0.22µmのMCE Membrane (Millipore) を用いて1-4mlにまで濃縮した。濃縮した試料全量を通常の1/100倍になるように調整したNB培地 (Difco) と0.1mM NH₄Clを含む100mlの好適環境水に添加して25°Cで浸透培養した。今回使った好適環境水の組成は以下の通りである: 7.0587 g/l NaCl, 0.3641 g/l CaCl₂ · 2H₂O, 0.18125 g/l KCl。その後、1週間ごとに1/1000倍になるように調整したNB培地と0.01mM NH₄Clを添加し、3週間培養を行った。

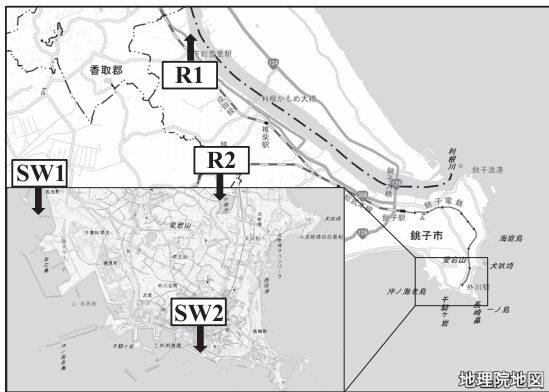


図1 試料採取を行った場所

2. 2 細菌数の測定

一般細菌の分離、菌数測定に利用されるパールコア®普通寒天培地(栄研)に希釈した各試料を塗布した。25°Cで2日間培養し、生じたコロニー数を計測して1mlあたりのcolony forming unit (CFU) を求めた。

2. 3 ゲノムDNAの抽出

採取した試料100mlをろ紙を3枚重ねて濾過した。濾液を0.22µmのMCE Membraneを用いて濾過し、ろ紙を通過した濾液中に含まれる細菌を全てメンブレン上に移した。DNA抽出キットZymoBIOMICS DNA Mini Kit (ZYMO RESEARCH) を使ってメンブレンから細菌のゲノムDNAを抽出・精製した。

2. 4 細菌叢解析

精製したゲノムDNAを鋳型として使用し、16S rDNA

のv3-v4領域に特異的なプライマーV3V4f_MIX (5'-ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCT-NNNNN-CCTACGGGNGGCWGCAG-3')及びV3V4r_MIX: GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCT-NNNNN-GACTACHVGGGTATCTAATCCを用い、PCRによって16S rDNA断片を増幅した。PCRの反応条件は以下に示す通りである。94°C:1分、52°C:2分、72°C:2分を1サイクルとし、25サイクルで行った。さらに、PCR産物を鋳型とし、2ndFプライマー(5'-AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACAC-Index2-ACACTCTTTCCCTACACGACGC-3')及び2ndRプライマー(5'-CAAGCAGAAGACGGCATACGAGAT-Index1-GTGACTGGAGTTCAGACGTGTG-3')を用いて、2度目のPCRによって16SrDNA断片を増幅した。Index1及びIndex2はMiseqシーケンス反応に用いられる。2度目のPCRの反応条件は以下の通りである。94°C:30秒、60°C:30秒、72°C:30秒を1サイクルとし、10サイクルで行った。PCR産物を精製し、MiSeq (Illumina) を用いて2x300bpの条件でシーケンシングを行った。得られた塩基配列情報をもとに遺伝子解析ソフトQIIMEを使用してデータ解析を行った。

3. 結果と考察

細菌叢解析を行うにあたり、最初に試料に含まれる細菌数を一般細菌培養用の寒天培地を用いて測定した。通常の寒天培地で培養可能な細菌は全体の0.1-1%程度と言われており²⁾、実際の細菌数を正確に反映した結果ではない。また、海洋細菌には十分な塩濃度を必要とするものが多く、増殖できなかった可能性もあるが、一般細菌培養用の培地を利用して細菌数の増減の傾向を調べることは可能であると考えた。各試料の細菌数を測定した結果、培養前は淡水よりも海水試料の細菌数が少なく、培養後には増加して全ての試料で同程度の細菌数となった(表1)。培養後の総細菌数が最大で10000倍程度に増加したが、これは好適環境水での培養の際に栄養源を加えたことが原因と考えられる。細菌叢解析のために抽出されたDNA量を比較した場合、本研究での抽出効

表1 一般細菌数

試料	培養前		培養後	
	CFU	SD	CFU	SD
SW1	3.2E+02	1.2E+02	4.6E+06	1.9E+06
SW2	2.0E+02	7.3E+01	1.2E+06	4.3E+05
R1	2.5E+03	9.9E+02	7.7E+05	2.4E+05
R2	1.0E+03	5.4E+02	1.8E+06	4.1E+05

試料を採取後、好適環境水で3週間培養した
CFU: 1ml当たりのコロニー数、SD: 標準偏差

表2 細菌叢解析によって得られた属・種数の変化

	培養前				培養後			
	SW1	SW2	R1	R2	SW1	SW2	R1	R2
総リード数	33646	35528	29755	31778	37358	37714	39177	33177
属の総数	324	277	286	229	182	137	199	178
種の総数	1646	1347	1213	2032	1203	445	909	523

率が不明のため定量的な比較は難しいが数倍程の差で一般細菌数と同様に増加する傾向が見られた。細菌叢解析により試料中の各細菌の相対検出頻度を求められるが、各試料を比較する際に同じ種の細菌が存在した場合はこの点を考慮する必要がある。

細菌叢解析の結果得られたリード数、属および種の総数を表2に示した。リード数は解析に使われた16s rRNA遺伝子v3-v4領域の数を示すため、解析した細菌の数であるといえる。今回使用した各試料は30000-40000程のリード数であり、細菌叢解析に十分な数が得られている。各試料の種の総数、属の総数を比較すると好適環境水での培養後には種・属ともに減少していることが分かった。この結果から、好適環境水は海水、淡水などに比べ、細菌に対する選択性を有している可能性が高く、これは浸透圧の違いにより海水、淡水どちらの細菌も増殖し難くなるという考えに一致するものである。しかし、栄養源の影響も考えられるため、海水、淡水を用いて同じ条件で培養した場合との比較が必要であり、今後の課題である。

図2は各試料において相対検出頻度の高い上位10属の細菌を示している。各試料に含まれる細菌の属の総数は137~324であるが(表2)全ての試料において最も相対検出頻度の高い1属の細菌のみで20-30%を占めている。海水試料である培養前のSW1、SW2および培養後のSW1において最も多いRhodobacterace科に属する細菌群は、海洋細菌としても知られており有機物を代謝し、独立栄養成長する³⁾。Flavobacterium属の細菌を含むFlavobacteriaceae科の細菌群については様々な水域に広く分布する細菌であることが知られている⁴⁾。利根川から採取した試料であるR1の培養前の細菌叢においてもRhodobacterace科の相対検出頻度が高いことから、採取した場所の試料は海水に近い汽水であったと考えられる。培養前のR2は海水試料に見られたFlavobacteriaceae科の細菌群が25%と最も高かった。R2において2番目の相対検出頻度であるFluviicola属の細菌は海水⁵⁾、淡水⁶⁾の両方で見つかっている。10%以上の相対検出頻度は培養前の試料の中では3番目に多い値でありFluviicola属の細菌が水域に数多く存在していることを示している。高相対検出頻度細菌群以外の細菌の相対検出頻度は10%未満であるが、R1、R2に見られるように、この部分がそれぞれの試料に特有の部分でもあり、通常は周りの環境に応じて変化が激しい部分であると考えられる。好適環

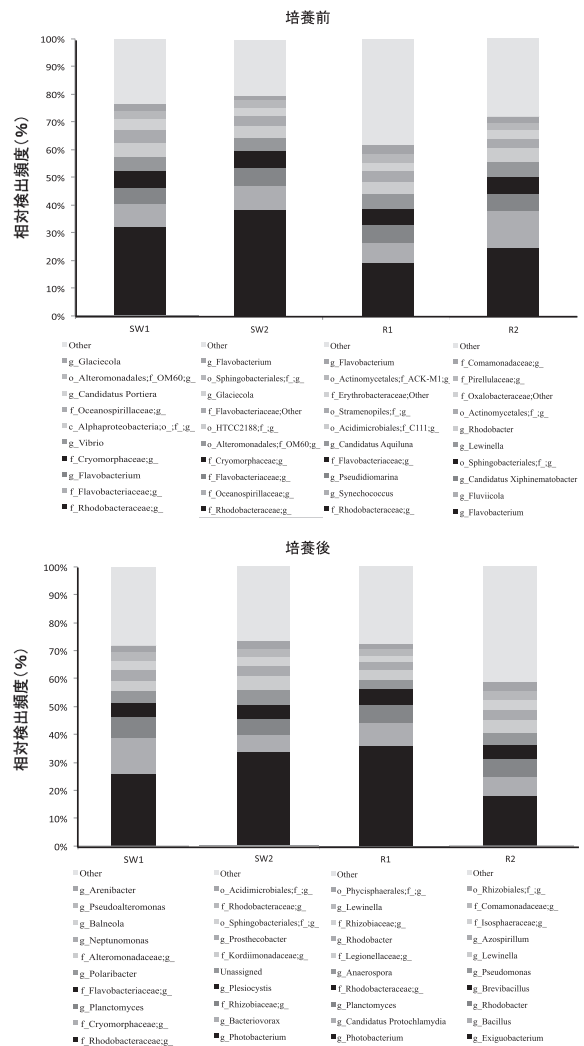


図2 相対検出頻度の高い上位10属の細菌

境水で培養後の各試料を培養前と比較すると、SW1では比較的相対検出頻度の低い属の細菌群では変化が見られた。SW2、R1ではPhotobacterium属の細菌が、R2ではExiguobacterium属の細菌が最も相対検出頻度の高い細菌群として検出された。Photobacterium属の細菌は海水中に普遍的に存在しているが、特徴として増殖にナトリウムイオンを必要とすることが挙げられる。採取地の異なる2種類の試料を培養しているにも関わらずどちらもPhotobacterium属の細菌が増えていることから、好適環境水の塩分組成が他の海洋細菌よりもPhotobacterium属に適していると考えられる。Exiguobacterium属の細菌は過酷な環境下で生存している細菌として知られる細菌で、シベリアの200-300万年前の永久凍土からも見つかっている⁷⁾。この細菌は極限環境だけでなく、普遍的に存在している細菌であり、その生存能力の高さから他の淡水由来の細菌よりも好適環境水に含まれる塩分の影響を受けずに増殖できたのかも知れない。

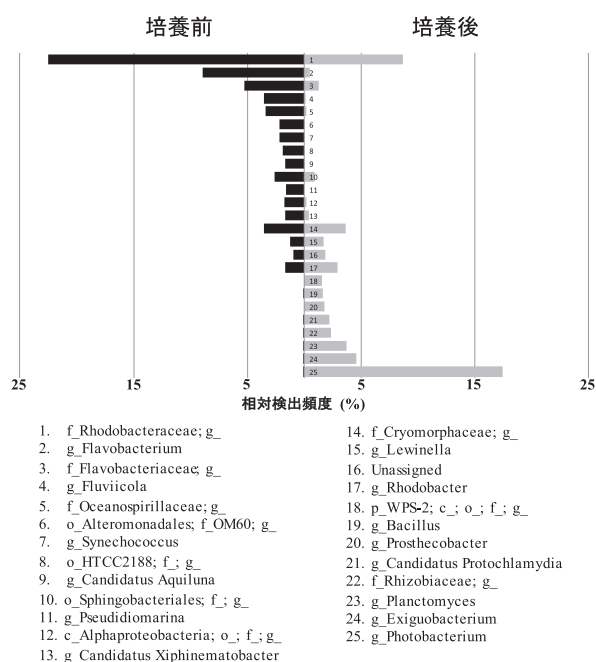


図3 培養前後の相対検出頻度の変化が大きい細菌

採取地の異なる4つ試料を1つの試料とし、好適環境水での培養前後で相対検出頻度の変化が大きい細菌を比較した。培養前から培養後の相対検出頻度の値を引き、数値が高い細菌から順に並べた。相対検出頻度が1.5%未満の属は解析対象から除いた。

それぞれの試料では細菌叢の違いが見られ、培養前後においても変化が見られる。しかし、好適環境水の影響を検討するためには全体的な比較が必要である。そこで、培養前の試料全て（SW1、SW2、R1、R2）と培養後の試料全てをそれぞれまとめ、培養前と培養後の2種類の細菌叢として捉え比較した（図3）。全体に占める割合が1.5%未満の属を除いた後に、培養前から培養後の相対検出頻度の値を引き、数値の高い細菌から順に並べた。1番目のRhodobacterace科の細菌群の相対検出頻度は培養後に減少しているが、培養後においてもSW1では最も相対検出頻度が高く、他の試料でも上位10属に含まれる（図2）。このことからRhodobacterace科の細菌は好適環境水による増殖抑制などの影響が少ないと考えられる。2-9番目の細菌群（Flavobacterium属、Flavobacteriaceae科、Fluviicolazo属、Oceanospirillaceae科、OM60科、Synechococcus属、HTCC2188目、Candidatus Aquiluna属）は培養後に相対検出頻度が減少していることから好適環境水による影響により増殖が阻害されていると考えられる。一方、18-25番目までの細菌群（WPS-2門、Bacillus属、Prostheco bacter属、Candidatus Protochlamydia属、Rhizobiaceae科、Planctomyces属、Exiguobacterium属、Photobacterium属）は相対検出頻度が増加していることから、好適環境水が増殖に適してい

表3 ヒトに対して病原性を示す細菌を含む属のリード数の変化

属	種の総数	培養前				培養後			
		SW1	SW2	R1	R2	SW1	SW2	R1	R2
<i>Vibrio</i>	72	1796	137	3	0	108	56	3	0
<i>Streptococcus</i>	3	5	0	1	0	0	3	0	0
<i>Staphylococcus</i>	2	9	3	0	0	0	0	0	1
<i>Rickettsia</i>	2	0	0	0	1	0	0	0	21
<i>Pseudomonas</i>	15	3	2	13	0	0	123	167	1475
<i>Mycobacterium</i>	10	4	0	16	3	0	165	3	5
<i>Leptospira</i>	1	0	0	0	31	0	0	0	0
<i>Legionella</i>	8	0	0	0	0	0	0	72	4
<i>Francisella</i>	4	4	3	43	0	0	0	0	0
<i>Clostridium</i>	15	2	4	13	8	0	0	7	3

るもしくは影響を受けないと考えられる。本研究では培養前後で減少する細菌と増加する細菌の性質を調べていないため、その原因は不明であるが、好適環境水を用いて培養することにより特定の細菌が選択的に減少もしくは増殖することは明らかとなった。

今回検出された細菌の中でヒトに病原性を示す細菌と同属のものは*Clostridium*、*Francisella*、*Legionella*、*Leptospira*、*Mycobacterium*、*Pseudomonas*、*Rickettsia*、*Staphylococcus*、*Streptococcus*、*Vibrio*の各属であった（表3）。海水由来の試料であるSW1では、好適環境水で培養することにより*Vibrio*属の顕著な減少がみられた。同じく海水由来の試料であるSW2では、*Vibrio*属の総リード数はSW1に比べて1/20程度であったが、同様に好適環境水による培養によりリード数の顕著な減少がみられた。汽水、淡水由来試料であるR1、R2では好塩菌である*Vibrio*属の検出はほとんど見られなかった。また、淡水由来試料R1からは*Francisella*属が、R2からは*Leptospira*属が検出されたが、これらは好適環境水による培養によって減少し、3週間後には検出されなかった。これらは、好適環境水の塩濃度が細菌の生育に不適切な濃度であることに由来すると考えられた。特に*Vibrio*属では*Vibrio parahaemolyticus*等の魚介の生食による食中毒を引き起こす細菌の生育を阻害できることから、好適環境水の養殖への利用は食中毒予防のためにも有効であると考えられた。一方で、好適環境水による培養で増加した細菌も確認された。*Mycobacterium*属はSW2で、*Legionella*属はR1で、*Rickettsia*属はR2でそれぞれ増加がみられた。*Mycobacterium*属、*Legionella*属、*Rickettsia*属いずれも細胞内寄生性を有する細菌であり、好適環境水による培養で、自由生活型アメーバなどの真核生物が増加したことに由来すると考えられた。また*Pseudomonas*属はSW2、R1、R2で増加がみられ、特にR2で顕著であった。これらのことから、好適環境水は真核単細胞生物の増殖や細菌のバイオフィーム形成などを促進することが推測された。*Clostridium*、*Staphylococcus*、*Streptococcus*属につ

表4 魚病の原因細菌

属	種	ref
<i>Aeromonas</i>	<i>hydrophila</i>	8
<i>Aeromonas</i>	<i>salmonicida</i>	9
<i>Edwardsiella</i>	<i>tarda</i>	10
<i>Flavobacterium</i>	<i>branchiophilum</i>	11
<i>Flavobacterium</i>	<i>columnare</i>	12
<i>Flavobacterium</i>	<i>psychrophilum</i>	13
<i>Francisella</i> *	sp.	14
<i>Lactococcus</i>	<i>garvieae</i>	15
<i>Mycobacterium</i> *	<i>marinum</i>	16
<i>Nocardia</i>	<i>seriola</i>	17
<i>Photobacterium</i>	<i>damselae</i> subsp. <i>Piscicida</i>	18
<i>Piscirickettsia</i>	<i>salmonis</i>	19
<i>Pseudomonas</i> *	<i>anguilliseptica</i>	20
<i>Pseudomonas</i> *	<i>plecoglossicida</i>	21
<i>Renibacterium</i>	<i>salmoninarum</i>	22
<i>Streptococcus</i> *	<i>dysgalactiae</i>	23
<i>Streptococcus</i> *	<i>iniae</i>	24
<i>Vibrio</i> *	<i>anguillarum</i>	25
<i>Yersinia</i>	<i>ruckeri</i>	26

*: 表3に含まれる

いては検出されたものの、培養前後でのリード数がいずれのサンプルでも低く、培養による菌数の増減はなかった。

表4は魚病の原因細菌を示している。ヒトに病原性を示す細菌と同属の細菌の中には魚病細菌として知られているものもあり、表3の*Francisella*属、*Mycobacterium*属、*Pseudomonas*属、*Streptococcus*属、*Vibrio*属の細菌は表4においても見られた。表4に示した魚病細菌の中で相対検出頻度に明らかな減少が見られたのは全体比較(図3)でも見られた*Flavobacterium*属と*Vibrio*属の細菌群のみである。好適環境水を用いた魚類等の飼育では病気の発症率が低いことが経験的に知られており²⁷⁾、*Flavobacterium*属および*Vibrio*属の細菌の増殖抑制が魚病発症率の低下に寄与していると考えられる。また、培養後に最も増加の見られた*Photobacterium*属の細菌も魚病細菌として含まれているが、今回得られた16S rRNA遺伝子の配列をもとにBLAST解析を行った結果、95%の同一性しか示さなかった。つまり、本研究で見出された好適環境水中で相対検出頻度の高い*Photobacterium*属の細菌は、魚病の病原細菌である*Photobacterium damsela* subsp. *Piscicida*とは同属別種の細菌であると言える。

既に多くの細菌が硝化細菌として知られている。本解析で見つかったのはアンモニアを酸化する細菌を含む*Nitrosomonadaceae*科の細菌²⁸⁾、亜硝酸酸化細菌である*Nitrospira*属の細菌²⁹⁾であった。*Nitrospina*属の細菌は検出されていない試料も多く、リード数も合計で

10未満であるため比較対象とならなかったが、R1では*Nitrosomonadaceae*科の細菌のリード数は培養前が0、培養後は250であり、十分に増加していると言える。好適環境水に窒素源であるアンモニアを添加しているためアンモニア酸化細菌が増殖したが、亜硝酸酸化細菌が増殖するレベルまでは亜硝酸が蓄積していない、もしくは亜硝酸酸化細菌の増殖が抑制されていると考えられる。本研究では好適環境水下で3週間培養した時の細菌叢の変化を見ているが、硝化細菌は倍加時間が非常に長いと言われており、さらに長期間培養した場合の細菌叢の変化を調べる必要がある。他の細菌の組成も長期間培養により変化する可能性が高く、3週間の培養では少数存在していた細菌が淘汰されていくのか、硝化細菌のような増殖に時間のかかる細菌が少しずつ増えていくのか、経時変化についても非常に興味深い。更に魚の飼育環境では本研究とは条件の異なる部分が多いため、実際に好適環境水で魚を飼育した場合に細菌叢にどのような変化が起こるのかを調べる予定である。

参考文献

- 1) 学校法人加計学園. 人工飼育水及び人工飼育水生生物質. WO 2009/153954 A1 (23. 12. 2009)
- 2) Staley JT and Konopka A : Measurement of in situ activities of nonphotosynthetic microorganisms in aquatic and terrestrial habitats. Annual Review of Microbiology, 39, 321-346, 1985.
- 3) Brinkhoff T, Giebel HA, Simon M : Diversity, ecology, and genomics of the Roseobacter clade : a short overview. Archives of Microbiology, 189, 531-539, 2008.
- 4) Kirchman DL : The ecology of *Cytophaga-Flavobacteria* in aquatic environments. FEMS Microbiology Ecology, 39, 91-100, 2002.
- 5) O'Sullivan L A, Rinna J, Humphreys G, Weightman AJ, Fry JC : *Fluviicola taffensis* gen. nov., sp. nov., a novel freshwater bacterium of the family *Cryomorphaceae* in the phylum 'Bacteroidetes'. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 55, 2189-2194, 2005.
- 6) Muramatsu Y, Tkahashi M, Kamakura Y, Suzuki K, Nakagawa Y : *Salinirepens amamiensis* gen. nov., sp. nov., a member of the family *Cryomorphaceae* isolated from seawater, and emended descriptions of the genera *Fluviicola* and *Wandonia*. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 62, 2235-2240, 2012.
- 7) Rodrigues DF, Goris J, Vishnivetskaya T, Gilichinsky D, Thomashow MF, Tiedje JM : Characterization of *Exiguobacterium* isolates from the Siberian permafrost. Description of *Exiguobacterium sibiricum* sp. nov. Extremophiles, 10, 285-294, 2006.
- 8) Rigney MM, Zilinsky JW, Rouf MA : Pathogenicity of *Aeromonas hydrophila* in red leg disease in frogs. Current Microbiology, 1, 175-179, 1978.
- 9) Marsh MC : *Bacterium truttae*, a new species of bacterium pathogenic to trout. Science, 16, 706-707, 1902.
- 10) Wakabayashi H, Egusa S : *Edwardsiella tarda* (*Paracolobactrum anguillimortiferum*) associated with pond-cultured eel disease. Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries, 39, 931-936, 1973.
- 11) Kimura N, Wakabayashi H, Kudo S : Studies on bacterial gill disease in salmonids I. Selection of bacterium transmitting gill disease. Fish pathology, 12, 233-242, 1978.
- 12) Decostere A, Haesebrouck F, Devriese LA : Characterization of four *Flavobacterium columnare* (*Flexibacter columnaris*) strains isolated from tropical fish. Veterinary Microbiology, 62, 35-45, 1998.
- 13) Lorenzen E, Dalsgaard I, From J, Hansen EM *et al.* : Preliminary investigations of fry mortality syndrome in rainbow trout. Bulletin of the European Association of Fish Pathologists, 11, 77-79, 1991.
- 14) Kamaishi T, Fukuda Y, Nishiyama M, Kawakami H *et al.* : Identification and pathogenicity of intracellular *Francisella* bacterium in three-line grunt *Parapristipoma trilineatum*. Fish Pathology, 40, 67-71, 2005.
- 15) Collins MD, Farrow JA, Phillips BA, Kandler O : *Streptococcus garvieae* sp. nov. and *Streptococcus plantarum* sp. nov. Journal of general microbiology, 129, 3427-3431, 1983.
- 16) Austin B, Austin DA : "Gram-Positive Bacteria", Bacterial fish pathogens, disease of farmed and wild fish, 3rd ed., Springer, 52-54, 1999.
- 17) 狩谷貞二, 窪田三朗, 中村恵江, 吉良桂子 : 養殖ハマチ・カンパチにおけるノカルジア症について-I. 魚病研究, 3, 16-23 (1968) .
- 18) Zorrilla I, Balebona MC, Mori-igo MA, Sarasquete C, Borrego JJ : Isolation and characterization of the causative agent of pasteurellosis, *Photobacterium damsela* ssp. piscicida, from sole, *Solea senegalensis* (Kaup). Journal of Fish Diseases, 22, 167-172, 1999.
- 19) Bravo S, Campos M : Coho salmon syndrome in Chile. American Fisheries Society/Fish Health Section Newsletter, 17, 3, 1989.
- 20) Wakabayashi H, Egusa S : Characteristics of a *Pseudomonas* sp. from an epizootic of pond cultured eels (*Anguilla japonica*). Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries, 38, 577-587, 1972.
- 21) Nishimori E, Kita-Tsukamoto K, Wakabayashi H : *Pseudomonas plecoglossicida* sp. nov., the causative agent of bacterial hemorrhagic ascites of ayu, *Plecoglossus altivelis*. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 50, 83-89, 2000.
- 22) Sanders JE, Fryer JL : *Renibacterium salmoninarum* gen. nov., sp. nov., the causative agent of bacterial kidney disease in salmonid fishes. International Journal of Systematic Bacteriology, 30, 496-502, 1980.
- 23) Nomoto R, Munasinghe LI, Jin DH, Shimahara Y, *et al.* : Lancefield group C *Streptococcus dysgalactiae* infection responsible for fish mortalities in Japan. Journal of Fish Diseases, 27, 679-686, 2004.
- 24) Pier GB, Madin SH : *Streptococcus iniae* sp. nov., a beta-hemolytic streptococcus isolated from an Amazon freshwater dolphin, *Inia geoffrensis*. International Journal of Systematic Bacteriology, 26, 545-553, 1976.
- 25) Nakai T, Kanno T, Cruz ER : The effects of iron compounds on the virulence of *Vibrio anguillarum* in Japanese eels and ayu. Fish Pathology, 22, 185-189, 1987.

- 26) Romalde JL, Toranzo AE : Pathological activities of *Yersinia ruckeri*, the enteric red mouth (ERM) bacterium. FEMS Microbiology Letters, 112, 291-300, 1993.
- 27) 山本俊政：好適環境水が拓く未来の養殖！：山村を漁村に。耐火物, 65, 107, 2013.
- 28) Winogradsky S : Contributions à la morphologie des organismes de la nitrification. Archives des Sciences Biologiques (St. Petersburg). 1, 86-137, 1892
- 29) Stanley WW, Eberhard B, Frederica WV, John BW, Ursula S : *Nitrospira marina* gen. nov. sp. nov.: a chemolithotrophic nitrite-oxidizing bacterium. Archives of Microbiology, 144, 1-7, 1986.