

好適環境水利用時の細菌叢の経時変化

Temporal variations of the bacterial flora in The Third Water

小林 照幸・中山 美月・福井 貴史

Teruyuki KOBAYASHI, Mizuki NAKAYAMA and Takashi FUKUI

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。我々は以前の報告において、2箇所から採取した海水、淡水の試料を好適環境水で3週間培養し、培養前後の細菌叢の変化を調べた。

本研究では好適環境水で6ヶ月培養し、その後の細菌叢の変化を調べた。その結果、細菌叢の組成は添加した試料および培養期間によって大きく異なっていた。2つの試料に共通して増加もしくは減少する細菌を調べた結果、減少する細菌群は海洋性細菌が多く、増加する細菌は栄養源の代謝に関わる細菌が多いという傾向が見られた。培養後は科および属の総数も減少していたことから、好適環境水を用いた培養では明らかに特定の種類の細菌群の増殖に対して抑制的に作用している可能性が示唆された。

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塩類を溶解した水であり、閉鎖循環式陸上養殖での使用において様々なメリットが知られている¹⁾。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が、通常2群の硝化細菌により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、閉鎖循環式陸上養殖において、種々の細菌が非常に深く関わっているにもかかわらず、好適環境水を用いた閉鎖循環式陸上養殖に関わる細菌の報告はほとんど見られない。

我々は以前の報告において、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、好適環境が種々の細菌に何らかの影響を与えることを明らかにした²⁾。しかし、数ヶ月から数年行われる陸上養殖の期間と比較すると、3週間の培養期間は短く、長期間培養した時の変化についても調べる必要があった。本研究では以前の報告の間

題点に着目し、長期間培養時の細菌叢の変化を調べることと好適環境水が細菌に及ぼす影響を調べた。

2. 実験方法

2.1 試料の調整

千葉県銚子市内の2ヶ所から海水および淡水を採取し、培養前の試料とした²⁾。試料名と採取地の緯度、経度は次の通りである。銚子マリナー海水浴場付：SW1 (35°42'30.6"N 140°50'14.4"E)、銚子市桜井町公園付近・利根川：R1 (35°42'35.5"N 140°51'29.3"E)。採取した試料100 mlをろ紙を3枚重ねて濾過した後、濾液を0.22 μmのMCE Membrane (Millipore)を用いて1-4 ml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0.1 mM NH₄Clを含む100 ml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0.01 mM NH₄Clを添加し、6ヶ月間培養を行った。

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

連絡先：小林照幸 tkobayashi@cis.ac.jp

千葉科学大学大学院薬学研究科

Graduate School of Pharmacy, Chiba Institute of Science
Graduate School

(2019年9月30日受付, 2019年12月13日受理)

で2日間培養し、生じたコロニー数を計測して1 ml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 100 ml をろ紙を3枚重ねて濾過した。濾液を0.22 μm 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 rRNA 遺伝子のv3-v4領域に特異的なプライマー V3V4f_MIX (5'-ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCT-NNNNN-CCTACGGGNGGCWGCAG-3') および V3V4r_MIX (GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCT-NNNNN-GACTACHVGGGTATCTAATC) を用い、PCRによって16S rRNA 遺伝子のDNA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'-AATGATACGCGACCACCGAGATCTACAC-Index2-ACACTCTTTCCCTACACGACGAC-3') および 2ndRプライマー(5'-CAAGCAGAAGACGGCATACGAGAT-Index1-GTGACTGGAGTTCAGACGTGTG-3') を用いて、2度目のPCRによって16S rRNA 遺伝子のDNA断片を増幅した。Index1 および 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)を用いて2 x 300 bp 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、試料中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³⁾、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、これらの細菌が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、R1では3週間後が最も多く、6ヶ月後もほとんど変化していない。一方、SW1では3週間後の増加が見られただけでなく、6ヶ月後もさらに増加

していた(表1)。R1とSW1の間に違いが生じた原因は、コロニーを形成できた菌株の違いによるものと思われる。菌数が最大で50000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、全ての細菌が好適環境水によって増殖が抑えられるわけではなく、増殖可能な細菌も存在することを示唆している。

表1. 一般細菌数

培養期間	R1		SW1	
	CFU	SD	CFU	SD
培養前	2.5E+03	9.9E+02	3.2E+02	1.2E+02
3週間	7.7E+05	2.4E+05	4.6E+06	1.9E+06
6ヶ月	5.3E+05	1.1E+05	1.8E+07	2.4E+06

CFU: 1 ml 当たりのコロニー数、SD: 標準偏差

2つの試料をそれぞれ好適環境水に添加後、3週間後および6ヶ月後に一般細菌数を測定した。

細菌叢解析の結果得られたリード数、科および属の総数を表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。各試料の科・属の総数を比較すると好適環境水での培養後には科・属ともに減少していることが分かった。この結果および総菌数の結果から、好適環境水は選択培地のように働き、特定の細菌の増殖が抑えられ、別の特定の細菌が増殖したと考えられる。好適環境水を用いた場合、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考えられてきたが、海水、淡水の細菌全てを網羅して説明できる性質ではなく、一部分の細菌に対し影響を及ぼすことが示唆された。

表2. 細菌叢解析によって得られた科・属数の変化

	R1			SW1		
	培養前	3週間	6ヶ月	培養前	3週間	6ヶ月
総リード数	28735	27254	30928	24354	28623	27474
科の総数	112	97	77	75	68	47
属の総数	143	129	95	115	111	70

図1は、R1を添加して培養したとき、図2は、SW1を添加して培養したときの、添加直後、3週間後および6ヶ月後の細菌叢解析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。添加直後と3週間後の試料において以前の報告²⁾と異なる結果が得られたが、16S rRNA 遺伝子の塩基配列データベースのアップデートより推定可能な菌種が充実化したためであると考えられる。

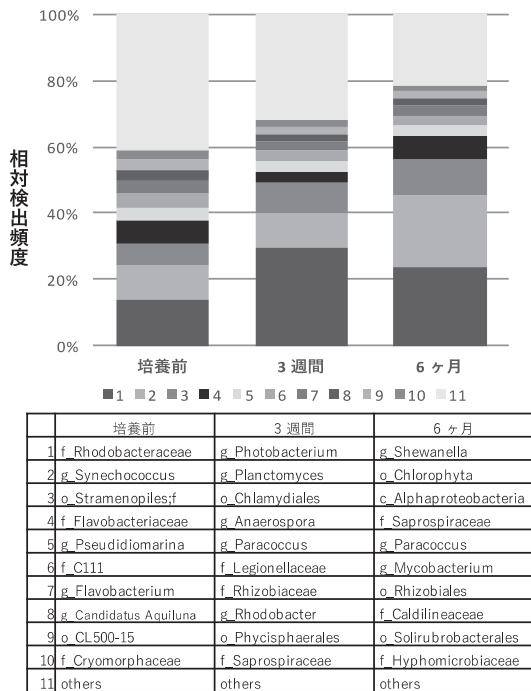


図1. R1 試料添加後の細菌叢解析

相対検出頻度の高かった上位 10 属の細菌を示している。属(g) レベルの推定ができなかった配列は、綱(c)、目(o)、科(f)レベルでの推定結果を示している。

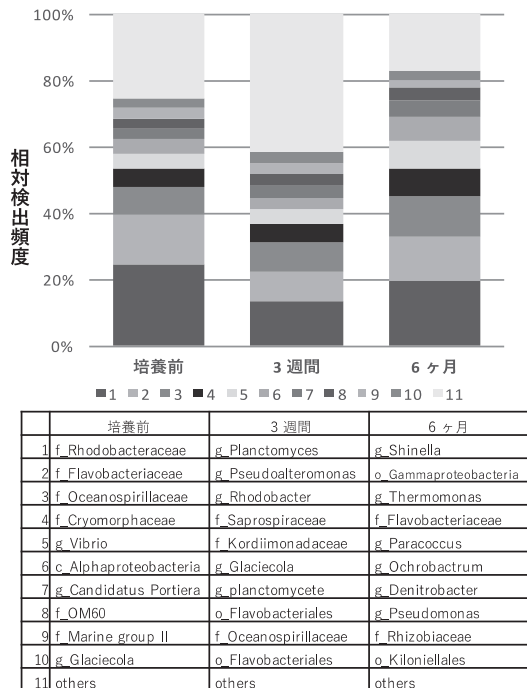


図2. SW1 試料添加後の細菌叢解析

相対検出頻度の高かった上位 10 属の細菌を示している。属(g) レベルの推定ができなかった配列は、綱(c)、目(o)、科(f)レベルでの推定結果を示している。

R1 の試料添加後の各試料 (図 1) に含まれる細菌の属の総数は 95-143 であるが (表2)、相対検出頻度の高い 10 属の細菌のみで全体の 60% 以上を占めており、培養期間が長くなるに従い増加していた。この結果からも、好適環境水が選択培地のように働いていることが示唆された。*Photobacterium* 属の細菌は 3 週間後に最も相対検出頻度の高い細菌群として検出されたが、6 ヶ月後には上位 10 属には含まれなかった。増殖にナトリウムイオンを必要とすることから好適環境水の組成が他の細菌よりも *Photobacterium* 属に適していると考えられたが、長期培養の間に他の細菌により分泌・蓄積された代謝産物などが増殖を阻害した可能性がその原因の一つとして考えられる。3 週間後および 6 ヶ月後を比較すると 6 ヶ月後には 9 属が別の属と入れ替わっており、それぞれの属の細菌に共通の特徴、もしくは好適環境水の存在下で優勢種となる原因は推定できなかった。

SW1 の試料添加後の各試料 (図 2) も R1 の場合と同様の傾向が見られ、属の総数の減少および 6 ヶ月後の試料において相対検出頻度の高い 10 属の細菌のみで全体の 80% 以上を占めた。SW1 は海水を採取した試料であるため、添加直後と 3 週間後の試料においては *Rhodobacteraceae* 科に属する細菌群⁴⁾ など海洋細菌としても知られる細菌が見られた。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 *Flavobacterium* 属の細菌を含む *Flavobacteriaceae* 科の細菌群⁵⁾ は全ての期間で見つかった。6 ヶ月後の試料では属レベルで推定できた細菌の中には典型的な海洋細菌は見つからず、好適環境水を用いた長期間の培養により、海洋細菌の増殖が抑制される可能性が示唆された。SW1 の試料を添加した場合においても、好適環境水の存在下で優勢種となる原因を推定できなかった。属名から *Denitrobacter* は脱窒作用を持つと思われる、塩化アンモニウムを連続で添加している培養条件下で相対検出率が上昇した理由となると考えられる。しかし、*Denitrobacter* 属の細菌に関しては特性等が述べられていると思われる報告が未公開となっており、他の報告は脱窒を示唆するもの、細菌叢解析などで 16S rRNA 遺伝子が見つかったものであった。

全ての試料で細菌叢の違いが見られ、相対検出率が増加した細菌の持つ共通の特徴も不明である。しかし、*Paracoccus* 属の細菌のみ R1 の試料で増加し続け、SW1 の培養試料においても 6 ヶ月後に上位 10 属に含まれていた。*Paracoccus* 属の特徴として、通性メチル栄養細菌で、多様な有機物を利用することができることが知られているが⁶⁾、この性質が好適環境水での増殖に何らかの影響を及ぼしているのかもしれない。

細菌叢の組成は常に変化し続ける可能性があるが、*Paracoccus* 属のように 2 つの異なる試料において、共通して増加もしくは減少し続ける細菌群は他の細菌の影

響よりも好適環境水の影響によって変化している可能性が高いと考えられる。そこで、属レベルで推定され、上記の条件を満たすものを選択し、表3と表4に示した。

表3. 相対検出率が減少した属

属名	R1			SW1			合計*
	培養前	3週間	6ヶ月	培養前	3週間	6ヶ月	
<i>Synechococcus</i>	10.0	0.07	0.00	1.59	0.00	0.00	11.6
<i>Vibrio</i>	0.02	0.00	0.00	4.83	2.98	0.00	4.85
<i>Candidatus Aquiluna</i>	3.43	0.00	0.00	0.07	0.00	0.00	3.51
<i>Candidatus Portiera</i>	0.02	0.00	0.00	3.26	0.00	0.00	3.28
<i>Arcobacter</i>	0.05	0.00	0.00	0.90	0.00	0.00	0.94
<i>Loktanella</i>	0.69	0.00	0.00	0.16	0.00	0.00	0.85
<i>Octadecabacter</i>	0.02	0.00	0.00	0.76	0.00	0.00	0.78
<i>Fluviicola</i>	0.46	0.02	0.00	0.09	0.00	0.00	0.55
<i>Acholeplasma</i>	0.38	0.00	0.00	0.05	0.00	0.00	0.43
<i>Sedimimicola</i>	0.10	0.00	0.00	0.04	0.00	0.00	0.15
<i>Balneola</i>	0.03	0.00	0.00	0.09	0.08	0.06	0.12
<i>Robiginitalea</i>	0.05	0.00	0.00	0.07	0.00	0.00	0.11
<i>Coralliomargarita</i>	0.04	0.00	0.00	0.02	0.00	0.00	0.06
<i>Saprospira</i>	0.01	0.00	0.00	0.01	0.00	0.00	0.02

*: 培養前の相対検出率の合計

数値は各試料における相対検出率を示す。

表4. 相対検出率が増加した属

属名	R1			SW1			合計*
	培養前	3週間	6ヶ月	培養前	3週間	6ヶ月	
<i>Thermomonas</i>	0.00	0.00	0.03	0.00	0.00	12.2	12.2
<i>Paracoccus</i>	0.00	3.28	3.31	0.00	1.92	8.05	11.4
<i>Hyphomicrobium</i>	0.00	0.00	1.61	0.00	0.00	0.44	2.05
<i>Phycococcus</i>	0.00	0.00	0.04	0.00	0.00	0.24	0.29
<i>Rhodoplanes</i>	0.00	0.00	0.02	0.00	0.00	0.07	0.09
<i>Halomonas</i>	0.00	0.00	0.04	0.00	0.00	0.03	0.07
<i>Aequorivita</i>	0.00	0.00	0.05	0.00	0.00	0.02	0.07

*: 6ヶ月培養の相対検出率の合計

数値は各試料における相対検出率を示す。

表3はR1とSW1の2つの異なる試料において、共通して減少した属を示している。これらの属のほとんどが海洋細菌として知られる細菌群であった。R1が河口近くの汽水域であったことから多くの海洋性細菌が含まれていたと考えられるが、一部の海洋性細菌は好適環境水中では増殖が抑えられる傾向にあると言える。総菌数(表1)および科・属の総数の減少(表2)から、好適環境水は一部分の細菌に対して増殖を抑制するような影響を及ぼすことが示唆されたが、これらの細菌に対しては、これまで考えられてきたように浸透圧の違いにより増殖し難くなったのかもしれない。また、*Vibrio* 属⁷⁾、*Arcobacter* 属⁸⁾、*Acholeplasma* 属⁹⁾などは有名な病原性細菌種を含んでおり、好適環境水に添加された多くの細菌種の中で、これらの細菌が減少を続けたことは興味深い結果であるが、他の海洋性細菌同様に浸透圧の影響か、その他の原因があるのかは不明である。

表4はR1とSW1の2つの異なる試料において、共通して増加した属を示している。減少した細菌群は海洋性細菌が多かったが、増加した細菌群は広く環境中から見つかっているものがほとんどである。*Thermomonas* 属の細菌は脱窒槽から見つかっているものもおり¹⁰⁾、今回の細菌叢解析データを種レベルで調べると1種が属未確定、もう一方が脱窒槽から見つかった菌種と同じ *Thermomonas fusca* であった。*Hyphomicrobium* 属の細菌は脱窒を行う通性メタン酸化細菌であることが知られている¹¹⁾。*Phycococcus* 属¹²⁾の細菌は未だ9株しか見つかっておらず、その特徴は不明な点もあるが、放線菌として知られている。*Rhodoplanes* 属¹³⁾は光合成細菌であり、ホパノイドを合成することが知られている。多くの細菌でホパノイドは、細胞膜の透過性を調整し、極端な環境条件に適応させるのに重要な役割を果たしている。*Halomonas* 属¹⁴⁾は好塩菌に分類され増殖には高濃度の塩化ナトリウムを必要とし、主に海で見つかっている。好適環境水での培養で *Halomonas* 属の細菌が増加した原因は不明であるが、種レベルの解析で一致する細菌は無く比較的低い塩濃度でも増殖可能な新種・属かもしれない。*Aequorivita* 属は¹⁵⁾海洋細菌の多くを占める *Flavobacteriaceae* 科に含まれ、これらの細菌群は有機物の分解に重要な役割を果たしていることが知られている。表4に見られる細菌の特徴を比較すると、脱窒、有機物の分解・利用など、添加される栄養源、塩化アンモニウムを代謝可能な細菌の中で好適環境水による増殖抑制の影響を受けないものが増殖したと考えられる。

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酸化細菌を含む *Nitrosomonadaceae* 科の細菌¹⁶⁾、亜硝酸酸化細菌を含む *Nitrospiraceae* 科の細菌¹⁷⁾であった。どちらも属レベルで一致する細菌は見つかっておらず、好適環境水に適した硝化細菌が増殖した可能性が考えられる。*Nitrospiraceae* 科の細菌は、科レベルでの同定であったため表4から除外しているが、R1、SW1共に常に増加しており、添加されるアンモニアを酸化していると考えられ、表4の他の細菌と同様に栄養源および好適環境水という環境の両面から選択され、増加したと考えられる。一方、*Nitrosomonadaceae* 属はR1では増加後減少、SW1では増加し続けた。アンモニアの酸化により亜硝酸が増加するため、SW1では増加し続けたと考えられるが、R1で一旦増加した *Nitrosomonadaceae* 属の細菌が減少した原因は亜硝酸を直接利用可能な細菌群が増加したためと考えられる。

4. 結論

本研究から、好適環境水の存在下では、その培養期間により細菌叢が変化することが明らかとなった。また、

好適環境水が細菌の増殖に与える影響の一部は、これまでに考えられてきたように、「浸透圧の違いにより細菌が増殖し難くなる」で説明可能であると思われるが、培養期間内における同一属の細菌群の増減など、全ての細菌に対して説明可能なものではない。細菌の増殖は、利用可能な栄養源、細菌の代謝産物など、好適環境水以外の物質に影響を受ける可能性が考えられ、好適環境水が細菌叢の変化に与える影響は未だ不明な点が残る。

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成物質. WO 2009/153954 A1 (23.12.2009)
- 2) 中山美月, 福井貴史, 小林照幸: 好適環境水利用時の細菌叢の変化. 千葉科学大学紀要, 12, 85-91, 2019.
- 3) Staley J T and Konopka A : Measurement of in situ activities of nonphotosynthetic microorganisms in aquatic and terrestrial habitats. Annual Review of Microbiology, 39, 321-346, 1985.
- 4) Brinkhoff T, Giebel H A, Simon M : Diversity, ecology, and genomics of the Roseobacter clade: a short overview. Archives of Microbiology, 189, 531-539, 2008.
- 5) Kirchman D L : The ecology of *Cytophaga-Flavobacteria* in aquatic environments. FEMS Microbiology Ecology, 39, 91-100, 2002.
- 6) Ludwig W, Mittenhuber G, Friedrich C G : Transfer of *Thiosphaera pantotropha* to *Paracoccus denitrificans*. Int J Syst Bacteriol. 43, 363-367, 1993.
- 7) C Michael H : Bacteria. Encyclopedia of Earth. National Council for Science and the Environment, Washington D. C., 2010.
- 8) Michael T M, Thomas D B : Brock Biology of Microorganisms, 12th edition. Pearson Education, San Francisco, 2009.
- 9) Windsor H M, Windsor G D, Noordergraaf J H : The growth and long term survival of *Acholeplasma laidlawii* in media products used in biopharmaceutical manufacturing. Biologics, 38, 204-210, 2010.
- 10) Wang L, Zheng S, Wang D et al. : *Thermomonas carbonis* sp. nov., isolated from the soil of a coal mine. Int J Syst Evol Microbiol, 64, 3631-3635, 2014.
- 11) Urakami T, Sasaki J, Suzuki K, et al. : Characterization and description of *Hyphomicrobium denitrificans* sp. nov. Intl J Syst Bacteriol, 45, 528-532, 1995.
- 12) Kim J P, Nguyen Y J, Hoang N L et al. : *Phycococcus ginsengisoli* sp. nov., isolated from cultivated ginseng soil. Int. J Syst Evol Microbiol, 66, 5320-5327, 2016.
- 13) Hiraishi A, Ueda Y : *Rhodoplanes* gen. nov., a new genus of phototrophic bacteria including *Rhodopseudomonas rosea* as *Rhodoplanes roseus* comb. nov. and *Rhodoplanes elegans* sp. nov. Int J Syst Bacteriol, 44, 665-673, 1994.
- 14) Vreeland R H, Litchfield C D, Martin E L, Elliot E : *Halomonas elongata*, a new genus and species of extremely salt-tolerant bacteria. Int J Syst Bacteriol, 30, 485-495, 1980.
- 15) Bowman J P, Nichols D S : *Aequorivita* gen. nov., a member of the family *Flavobacteriaceae* isolated from terrestrial and marine Antarctic habitats. Int J Syst Evol Microbiol, 52, 1533-1541, 2002.
- 16) Winogradsky S : Contributions à la morphologie des organismes de la nitrification. Archives des Sciences Biologiques (St. Petersburg). 1, 86-137, 1892.
- 17) Stanley W W, Eberhard B, Frederica W V, John B W, Ursula S : *Nitrospira marina* gen. nov. sp. nov.: a chemolithotrophic nitrite-oxidizing bacterium. Archives of Microbiology, 144, 1-7, 1986.