

好適環境水と各飼育水における細菌叢変化の比較

Comparison of changes in bacterial flora between The Third Water and each breeding water

小林 照幸・福井 貴史

Teruyuki KOBAYASHI 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。我々はいくつかの好適環境水を用いた培養で細菌叢がどのように変化するかを報告している。

本研究では淡水、好適環境水、希釈人工海水及びこれらに数種の栄養源を添加し、ニホンウナギ飼育水に含まれる細菌数及び細菌叢が培養の前後でどのように変化するかを調べた。細菌数は好適環境水のみを用いた場合、他の条件よりも少なかった。細菌叢は栄養源の有無にかかわらず、それぞれの飼育水で近い組成をしており、好適環境水と希釈人工海水も比較的似ていた。これまでの報告と同様に好適環境水の細菌の増殖の抑制効果は浸透圧の影響が考えられるが、特定の塩の濃度及び栄養要求性が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。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。

本研究ではこれまでに好適環境水を用いた飼育実績のあるニホンウナギを淡水下で飼育した後、これらに含まれる細菌を淡水、好適環境水、希釈海水及びこれらに数種の栄養源を添加して培養した。培養前後の細菌数及び細菌叢を比較することにより、好適環境水が細菌に及ぼす影響を

明らかにすることを目的とした。

2. 実験方法

2.1 試料の調製

ニホンウナギの飼育水（淡水で2年間飼育, 2週間毎に半分程度の水を交換）を採取した。採取した試料 1000 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 10 mL にまで濃縮した。濃縮した試料を各培地に添加して 25°C で1週間振盪培養した。今回使用した培地の組成は以下の通りである。水道水、好適環境水 (7.0587 g/L NaCl, 0.3641 g/L $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.18125 g/L KCl)、4倍希釈人工海水 (マリンアート SF-1) 及びそれぞれに 0.1 mM NH_4Cl 、5 g/L Yeast extract (Difco)、5 g/L ポリペプトン (WAKO) を添加した培地を使用した。

2.2 細菌数の測定

細菌数は粒子係数分析装置 (CDA-1000, SYSMEX) 及び一般細菌の分離、菌数測定に利用されるパールコア®普通寒天培地 (栄研) を用いて測定した。寒天培地を用いた場合には希釈した各試料を塗布し、25°C で2日間培養した後に、生じたコロニー数を計測して 1 mL あたりの細菌数を求めた。

連絡先: 小林照幸 tkobayashi@cis.ac.jp

千葉科学大学大学院薬学研究科

Graduate School of Pharmacy, Chiba Institute of Science
Graduate School

(2020年9月30日受付, 2021年1月7日受理)

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-NNNN-N-CCTACGGGNGGCWGCAG-3') および V3V4r_MIX (5'-GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCT-NNNNN-GACTACHVGGGTATCTAATC-3') 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'-AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACAC-Index2-ACACTCTTTCCCTACACGACGC-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 (illumine) を用いて 2x300 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 (open source software) を使用してデータ解析を行った。

3. 結果と考察

表 1 に 2 種類の方法で測定した細菌数の結果を示した。環境中には一般的な方法では培養不可能な細菌が多く存在しており、通常の寒天培地で培養可能な細菌は全体の 0.1-1% 程度と言われている²⁾。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。粒子数を元にして細菌数を測定した場合においても測定限界以下 (0.5 μm 以下の粒子径) の細菌が含まれている可能性が高く、寒天培地で測定した際の 100-1000 倍の細菌は計測されなかった。しかし、それぞれの測定法による細菌数を比較するとコロニー形成数よりも粒子数を元に測定した方が同程度から 10 倍多く検出された。粒子数による計測は培地による選択性がなく、より実際の細菌数を反映していると考えられる。

粒子数を元にした場合、培養前と比較して栄養源を添加

していない培地においても細菌の増殖が見られる。これは最初に添加したウナギ飼育水に含まれていた栄養源が原因と考えられる。栄養源を添加しなかった 3 種類の試料を比較すると、好適環境水を用いた場合に最も細菌の増殖数が少なかった。同程度の浸透圧である希釈人工海水と比較しても少ないことから、好適環境水の細菌増殖抑制作用は浸透圧の違いだけでは説明できないと考えられる。また、水と比較すると細菌数は少ないが、栄養源を加えた場合には増加が見られることから、好適環境水を用いた場合でも栄養源が存在すればそれを利用する細菌が増殖することが明らかであり、これまでの報告と一致する^{3,4)}。

表 1. 細菌数の比較

	コロニー数		粒子数	
	個/ml	SD	個/ml	SD
培養前水	1.1E+03	1.0E+02	1.7E+05	7.7E+03
添加なし	8.2E+05	3.1E+04	1.0E+06	1.6E+04
0.1 mM NH ₄ Cl	1.6E+06	1.7E+05	2.1E+06	6.3E+04
0.5% Yeast ext.	4.6E+06	6.6E+04	1.3E+07	5.5E+04
0.5% ポリペプトン	3.8E+06	3.2E+05	7.1E+06	3.9E+05
好適環境水				
添加なし	4.4E+05	1.8E+04	5.2E+05	8.7E+03
0.1 mM NH ₄ Cl	1.1E+06	1.4E+05	5.5E+06	9.0E+04
0.5% Yeast ext.	1.7E+06	7.1E+04	2.5E+06	2.8E+04
0.5% ポリペプトン	1.4E+06	9.9E+04	3.8E+06	6.9E+04
希釈人工海水 (1/4)				
添加なし	3.6E+05	2.3E+04	1.3E+06	1.6E+04
0.1 mM NH ₄ Cl	2.7E+05	3.1E+04	2.6E+06	2.2E+04
0.5% Yeast ext.	6.1E+05	4.7E+04	4.6E+06	4.0E+04
0.5% ポリペプトン	3.7E+05	1.1E+04	3.3E+06	2.2E+04

SD: 標準偏差

表 2. 細菌種の総数の比較

	リード数	属の総数
培養前水	28,361	180
添加なし	27,304	55
0.1 mM NH ₄ Cl	33,155	34
0.5% Yeast ext.	34,222	53
0.5% ポリペプトン	38,458	70
好適環境水		
添加なし	51,245	92
0.1 mM NH ₄ Cl	40,636	55
0.5% Yeast ext.	32,057	83
0.5% ポリペプトン	29,431	63
希釈人工海水 (1/4)		
添加なし	19,758	69
0.1 mM NH ₄ Cl	21,598	61
0.5% Yeast ext.	32,026	93
0.5% ポリペプトン	30,279	90

表 3. 培地の違いによる細菌叢の比較

OTU (Operational Taxonomic Unit) 解析を行い各試料で 200 カウント以上を示した細菌

目	検出細菌		培養前	水				好適環境水				希釈人工海水 (1/4)			
	科	属		none ^{a)}	N ^{b)}	Y ^{c)}	P ^{d)}	none	N	Y	P	none	N	Y	P
EW055			517							1		1			
Actinomycetales	Nocardioidaceae	Pimelobacter						334	41	23	5	120	27	4	23
Xanthomonadales	Xanthomonadaceae	Dokdonella	408												
Rhizobiales				473	1	161	39			13	1			74	37
Flavobacteriales	Flavobacteriaceae	Flavobacterium	454	1		2	1	1		3		1		49	4
Chlamydiales	Parachlamydiaceae	(Protochlamydia)	507	2											
Rhodospirillales	Rhodospirillaceae		159	275	82	28	276	6	1	6		2		4	1
Rhizobiales	Phyllobacteriaceae		16			1		12		244	34	27	57	146	535
Rhodobacterales	Rhodobacteraceae		1							1		695	74	59	162
Caulobacterales	Caulobacteraceae		3	2		27	5	1087		180	294		14	14	29
Actinomycetales	Nocardiaceae	Rhodococcus	7	11875	2368	330	1143	19	3254	2		4	25	2	15
Neisseriales	Neisseriaceae	Vogesella	43					189	8	1467	260	177	232	1997	1413
Legionellales			246	1				7	1		5	1	2	2	
Bdellovibrionales	Bdellovibrionaceae	Bdellovibrio	423												
Burkholderiales	Comamonadaceae			50	37	24	257				1				
Enterobacteriales	Enterobacteriaceae		267	20		13698	9	76	20	897	744	17	26	163	144
Pseudomonadales	Pseudomonadaceae	Pseudomonas						97		449	347	394	1258	5536	2726
Chlamydiales	Rhabdochlamydiaceae	(Rhabdochlamydia)	269	8	3	3	3	11	1	1			3		
Rhizobiales	Hyphomicrobiaceae										5	46		1	344
Methylophilales	Methylophilaceae								2			23	17	1	18
Legionellales	Legionellaceae	Legionella	1099	18	15	2	11	37	11	10	5	19	16	6	8
Burkholderiales	Comamonadaceae	Comamonas		1368	2497	3752	252	475	7	16	9	102	68	31	24
Actinomycetales	Mycobacteriaceae	Mycobacterium	533	6	3		4	2		4	1				1
Rhodospirillales	Rhodospirillaceae		769	11		1	11	41	27	23	9	26	16	17	33
Cytophagales	Cytophagaceae	Flectobacillus													2
Pseudomonadales	Pseudomonadaceae	Pseudomonas	5					212		8	19	7	53	153	56
Burkholderiales	Comamonadaceae	Comamonas		333		70						76		44	
Burkholderiales	Comamonadaceae		9	69	160	54	486	1	1						
Burkholderiales	Burkholderiaceae	Pandoraea	1	11095	16345	3279	735	4	96	16		6		2	8
Nitrospirales	Nitrospiraceae	Nitrospira	436												
Alteromonadales	Shewanellaceae	Shewanella	1131					127	102	1242	4247	604	4440	2296	3351
[Saprospirales]	Chitinophagaceae	Sediminibacterium	276	1120	590	742	1274	3963	2735	1744	2219	1147	818	1240	1566
Chlamydiales			1482				1								
Clostridiales	Clostridiaceae		279					1		1					
Rhizobiales	Rhizobiaceae		10	53	91	150	9	68	545	41	12	2	2	3	5
Rhizobiales			1018	15		2	27	10	4	12			1		
Flavobacteriales	Cryomorphaeae	Fluviicola	360	1				1				2		13	
Flavobacteriales	Flavobacteriaceae	Flavobacterium												45	1795
Burkholderiales	Comamonadaceae		1	5				29421							
Rhizobiales	Brucellaceae	Ochrobactrum	1				2	20	263	82	78	2		36	33
Alteromonadales	Shewanellaceae	Shewanella	192					22	26	221	614	108	662	295	464
Actinomycetales	Tsakamurellaceae	Tsakamurella		22	520	2									
Sphingomonadales	Sphingomonadaceae	Novosphingobium	4510			1	2	3		3		2	8	27	2
Alteromonadales	[Chromatiaceae]													56	458
Pseudomonadales	Pseudomonadaceae	Pseudomonas									1	286			
Aeromonadales	Aeromonadaceae		4213	15	7	66	23	31	50	6175	1348	83	292	6658	4976
MLE1-12			210					1		2		2			
Pseudomonadales	Pseudomonadaceae	Pseudomonas							1	523	314	7	15	49	7
Burkholderiales	Alcaligenaceae	Achromobacter		2	5	10	1	420	2552	306	94	7	26	33	158
Kiloniellales	Kiloniellaceae	Thalassospira	6					7775	10	5307	7149	9245	9452	8715	6837
Burkholderiales	Comamonadaceae		1				227	8		1		7	11	6	15
Legionellales	Coxiellaceae		449	5	1	1	1	12	2	1	1		3		1
Rhodospirillales	Rhodospirillaceae		328	5	4			12	14	87	1	1	1		3
Burkholderiales	Comamonadaceae		28	18		11	313								
Rhizobiales	Hyphomicrobiaceae	Hyphomicrobium	427	12	3	10	9	17	4	39	1		2	2	4
Pseudomonadales	Pseudomonadaceae	Pseudomonas	923	18	3		1	34687	30291	7163	7157	5438	2794	1923	3006
Rhizobiales	Rhizobiaceae		5					538	2	476	85	14	9	129	84
Pseudomonadales	Pseudomonadaceae	Pseudomonas	1	10	10131	5372		8	4	3966	2996	54	94	284	87

a) 添加なし、b) 0.1 mM NH4Cl、c) 0.5% Yest ext.、d) 0.5% ポリペプトン

上位 5 種

細菌叢解析の結果得られたリード数および科の総数を表 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最も少ないものでも約 20,000 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。各試料の科の総数を比較すると全ての試料での培養後に減少していることが分かった。これまでの報告^{3,4)}では好適環境水のみ使用していた為に細菌種の減少は好適環境水による影響であると考えられていたが、全ての培地で細菌種の減少が見られたことから、短期的には浸透圧の変化など、生育環境の変化が細菌種の減少を引き起こしていると考えられる。これらのことから、好適環境水は浸透圧の違い、特定の塩の濃度、栄養要求性などが関与し、細菌に対して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すると考えられる。好適環境水の特徴の一つとして、魚が魚病細菌による病気にかかりにくいという性質があるが、本研究結果は魚病細菌に特異的に作用するというものではない。好適環境水における魚病抑制のメカニズムについては未だ不明な点が残る。

表 3 は、各培地における細菌叢の違いを示している。OTU (Operational Taxonomic Unit) 解析を行い各試料で 200 カウント以上の細菌のみであるが、種が異なる可能性が高い場合には同属の細菌であっても重複して示されている。培養前の試料では、*Novosphingobium* 属⁵⁾、*Aeromonadaceae* 科⁶⁾、*Chlamydiales* 目⁷⁾、*Shewanella* 属⁸⁾、*Legionella* 属⁹⁾ の細菌が上位 5 種の細菌であったが、培養後にいずれかの試料の上位 5 種に含まれていたのは *Aeromonadaceae* 科、*Shewanella* 属の 2 種であった。*Aeromonadaceae* 科の細菌は主に汽水域、淡水域に見られることから、好適環境水もしくは希釈人工海水に栄養源を加えた汽水環境に近い条件で大幅な増加が見られたと考えられる。*Shewanella* 属の細菌は海水からも多く見ついている。希釈人工海水を用いた場合、全ての試料で *Shewanella* 属が上位 5 種に含まれている。好適環境水においてもポリペプトンを添加した場合のみ 3 番目に多い種となっている。好適環境水のみ、塩化アンモニウム添加では増殖が見られないことから海水、栄養源のみに含まれる成分が *Shewanella* 属の細菌の増殖に強く関与したと考えられる。

培養前に検出され、培養後に検出されなくなった細菌は *Dokdonella* 属¹⁰⁾、*Bdellovibrio* 属¹¹⁾、*Nitrospira* 属¹²⁾ の細菌である。*Dokdonella* 属の細菌は土壌細菌であり、*Bdellovibrio* 属の細菌は川の水または土壌に見られ、他の細菌のペリプラズムで生活している。このような生活環境のために培養直後には水を用いた場合でも検出限界以下の細菌数になったと考えられる。*Nitrospira* 属の細菌は硝化細菌として有名であり、増殖速度が遅いことが知られている。

。以前の報告では好適環境水においても長期間の培養で硝化細菌の増加が確認されている。

7 種類の *Comamonadaceae* 科の細菌¹³⁾ が表中に見られるが、好適環境水でのみ検出されない種、好適環境水と希釈人工海水の両方で検出されない種、どちらか一方で検出される種が存在した。本解析は属レベルまでの解析であり、どのような性質を持つ種がどのような影響を受けるかは不明であるが、少なくとも種レベル以下の違いが増殖の違いに関与していることは明らかとなった。

Sediminibacterium 属の細菌¹⁴⁾ は培養後の全ての試料で増加が見られた。*Sediminibacterium* 属は 2008 年に新たな属として分類され、現在までに複数の種が畑の土壌や池から見ついているが、新種としての報告が主なものである。我々の以前の報告においても検出されていない。今回使用したウナギ飼育水中に存在していた為、より生育に適した条件で増加したと考えられるが、本研究結果のみでは、全ての試料で増加した原因は不明である。

好適環境水及び希釈人工海水で増加が見られたのは *Pseudomonas* 属¹⁵⁾ と *Thalassospira* 属¹⁶⁾ の 2 種である。*Pseudomonas* 属は現在 200 種以上見つかり、その性質についても多岐にわたる。表 3 中においても 6 種類存在しており、その増減も様々である。*Comamonadaceae* 科の細菌と同様に属のみの特性によって増加した原因を推測することは困難であり、種以下の特性が関与していると考えられる。*Thalassospira* 属の細菌は海洋細菌として単離されている。属の特性に関する報告は見られないが、好適環境水及び希釈人工海水の両方で増加が見られたことからナトリウム、カリウム、カルシウムが増殖の促進に関与していると考えられる。

水、好適環境水、希釈人工海水ごとにそれぞれの細菌叢を比較すると、栄養源の有無、種類によって異なる部分が存在するが他の培地と比べると非常に似た細菌の組成であると言える。また、水と比較すると好適環境水と希釈人工海水の細菌叢の違いはごく一部であると言える。表 1 の結果から栄養源の有無が細菌数に影響を与えることが示されたが、表 3 の結果から細菌叢には大きな影響を与えないことが示唆された。

4. 結論

本研究から、好適環境水の存在下でのみ増加、減少する細菌、水では増加するが好適環境水もしくは希釈人工海水では減少する細菌などが見つかった。これらの比較から、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。しかし、同程度の浸透圧を持つ希釈人工海水との細菌数、細菌叢の比較から、特定の塩の濃度、栄養要求性などが関与していると考えられる。また、好適環境水中に存在する栄養源は細菌叢に大き

な影響を与えないことが示唆された。

本研究結果は、様々な特性を持つ細菌が好適環境水に影響を受けることを示唆しているが、魚病細菌に特異的に作用するというものではない。好適環境水における魚病抑制のメカニズムについて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) 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.
- 3) 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.
- 4) 小林照幸, 中山美月, 福井貴史 : 好適環境水利用時の細菌叢の経時変化. 千葉科学大学紀要, 13, 53-57, 2020.
- 5) Zhi-Pei L, Bao-Jun W, Ying-Hao L, Shuang-Jiang L : *Novosphingobium taihuense* sp. nov., a novel aromatic-compound-degrading bacterium isolated from Taihu Lake, China. Int. J Syst Evol Microbiol, 55, 1229-1232, 2005.
- 6) Colwell R R, Macdonell M T, Ley J D E : The ecology of *Cytophaga-Flavobacteria* in aquatic environments. Int J Syst Bacteriol, 36, 473-477, 1986.
- 7) Krzysztof N, Marian T, Monika S C : Chlamydiales-taxonomy, pathogenicity, and zoonotic potential. Bull Vet Inst Pulawy. 56, 267-270, 2012.
- 8) Yuri A G, Svetlana Y, Jeffrey S M et al. : Electrically conductive bacterial nanowires produced by *Shewanella oneidensis* strain MR-1 and other microorganisms. PNAS, 103, 11358-11363, 2006.
- 9) Fields B S, Benson R F, Besser R E : Legionella and Legionnaires' disease: 25 years of investigation. Clin Microbiol Rev, 15, 506-526, 2002.
- 10) Jung M Y, Kang M S, Lee K E, Lee E Y, Park S J : *Paraburkholderia dokdonella* sp. nov., isolated from a plant from the genus *Campanula*. J Microbiol, 57, 107-112, 2019.
- 11) Negus D, Moore C, Baker M, Raghunathan D, Tyson J, Sockett R E : Predator Versus Pathogen: How Does Predatory *Bdellovibrio bacteriovorus* Interface with the Challenges of Killing Gram-Negative Pathogens in a Host Setting? Annu Rev Microbiol, 71, 441-457, 2017.
- 12) Daims H, Wagner M : *Nitrospira*. Trends Microbiol, 26, 462-463, 2018.
- 13) Ge H, Batstone DJ, Keller J : Biological phosphorus removal from abattoir wastewater at very short sludge ages mediated by novel PAO clade *Comamonadaceae*. Water Res, 69, 173-182, 2015.
- 14) Wilson F P, Liu X, Mattes T E, Cupples A M: *Nocardioides*, *Sediminibacterium*, *Aquabacterium*, *Variovorax*, and *Pseudomonas* linked to carbon uptake during aerobic vinyl chloride biodegradation. Environ Sci Pollut Res Int, 23, 19062-19070, 2016.
- 15) Norberto J P : The *Pseudomonas* story. Environ Microbiol, 12, 1377-1383, 2010.
- 16) Dang T H Y, Tyagi S, D'Cunha G, Bhave M, Crawford R, Ivanova E P : Computational prediction of microRNAs in marine bacteria of the genus *Thalassospira*. PLoS One, 14, e0212996, 2019.