

養殖場環境を健全に維持する鍵を握る微生物群の多様性解析

谷口亮人

環境グループ

近畿大学大学院・農学研究科・水産学専攻・水族環境学研究室

給餌型の魚類養殖では、残餌や排泄物などによる自家汚染が相変わらず問題になっている。持続可能な養殖を行うためには、このような有機物負荷の大きい養殖場水域の自浄能力を把握することが不可欠となる。細菌群集は、微生物ループを介して環境中のほとんどの有機物を無機化している(すなわち自浄している)ため、その群集構造を明らかにすることがきわめて重要となる(Azam, 1999)。

本研究では、養殖場環境における細菌群集による自浄能力を把握する一助として、有機物分解に対して大きな役割を担っているであろう増殖細菌群の構造を調べた。

増殖細菌群の構造を解析するために、BrdU magnetic beads immunocapture PCR-DGGE (BUMP-DGGE)法を用いた(Taniguchi and Hamasaki, 2007)。BUMP-DGGE法は、DNAトレーサー法と変性剤濃度勾配ゲル電気泳動法(Denaturing Gradient Gel Electrophoresis: DGGE法)を組み合わせた手法である。DNAトレーサー法とは、チミジン(DNA合成前駆物質)の類似体であるブロモデオキシウリジン(BrdU)

のDNAへの取り込みを利用し、活発に増殖、すなわちDNA合成している細菌を検出する手法である。

材料と方法

2009年5・7・9・11月に近畿大学水産研究所の養殖場棧橋(水深約10m)から、1mおよび海底からマイナス1m(B-1m)深度海水を採取し、目合200 μ mナイロンメッシュで前濾過した。また、養魚生簀直下の底泥堆積物を柱状に採取し、容易に水中へ巻き上がる層を浮泥試料とした。増殖細菌群の解析のため、各試料に最終濃度1 μ Mとなるようにブロモデオキシウリジン(BrdU)を加え、現場海水温で5時間培養した。培養後、孔径3 μ mポリカーボネートフィルターおよび孔径0.22 μ mカートリッジフィルターで試料を濾過し、DNAを抽出・精製した後、BrdU標識DNAを分取し、16S rRNA遺伝子の一部をPCR増幅し、DGGE解析を行った。環境要因として、水温・塩分・クロロフィル濃度・全菌数を測定した。

Table 1 環境要因

Date	Depth m	WT °C	Sal	Chl <i>a</i> μ g L ⁻¹	BA (x10 ⁴ cells mL ⁻¹)	
					Free-living	Attached
May	1	21.6	33.7	4.24	146	6.5
	B-1	20.7	34.2	3.69	96.1	6.2
Jul	1	26.1	33.3	1.71	283	0.63
	B-1	24.7	33.6	0.69	114	0.70
Sep	1	26.4	33.6	0.50	105	2.7
	B-1	26.4	33.6	0.73	142	2.5
Nov	1	19.0	nd	nd	nd	nd
	B-1	20.0	nd	nd	nd	nd

WT: water temperature, Sal: salinity, BA: bacterial abundance, nd: not determined yet.

結果

水温は 19.0~26.4°C、塩分は 33.3~34.2 で変動していた (Table 1)。クロロフィル *a* 濃度は 0.50~4.24 $\mu\text{g L}^{-1}$ で大きく変動していた。全菌数は、>3 μm 画分 (以下、付着性細菌) は $0.63 \times 10^4 \sim 6.5 \times 10^4 \text{ cells mL}^{-1}$ 、0.22-3 μm 画分 (以下、自由游泳性細菌) は $96.1 \times 10^4 \sim 283 \times 10^4 \text{ cells mL}^{-1}$ であった。1 m と B-1 m 深度海水、浮泥試料において DGGE バンドパターンを比較したところ、海水および堆積物における全 DNA と BrdU 標識 DNA の DGGE バンドパターンにはそれぞれ違いが見られ、それら細菌群集構造が異なることがわかった (Fig. 1)。しかしながら、各月における BrdU 標識 DNA の DGGE バンドパターンにはあまり変化がなかった。増殖細菌群の 16S rRNA 遺伝子解析の結果、16 ファイロタイプを特定し、アルファプロテオバクテリア (ロゼオバクテラクレード) 8 種、ガンマプロテオバクテリア 3 種、バクテロイデテス 4 種、アクチノバクテリア 1 種、に近縁であった (Fig. 2)。

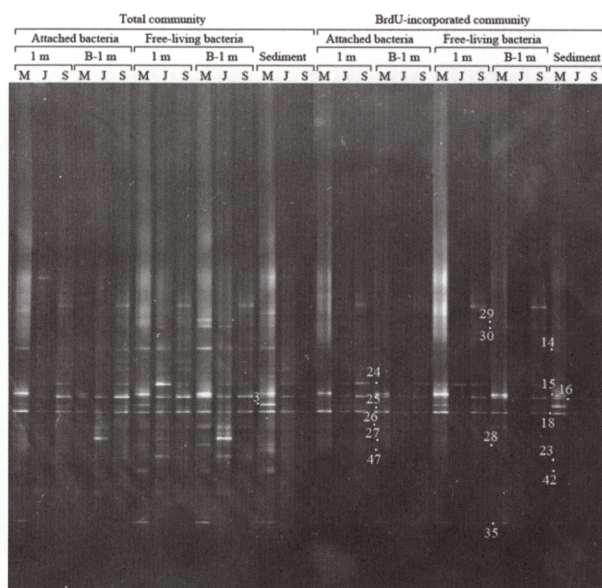


Fig. 1 全細菌群集と増殖細菌群の DGGE バンドパターン。各番号のバンドについて切り出しを行い、その塩基配列を決定した。M: 5 月、J: 7 月、S: 9 月

考察

BrdU 標識 DNA 分取後の PCR では、>3 μm 海水画分の DNA 試料が 0.22-3 μm 海水画分と比較してあまり増幅されなかった (data not shown)。これまでに、付着性細菌はチミジン取込み速度に対してロイシンの取込み速度の方が速いという報告があることから (寺西ら、2008)、本試料においても、付着性細菌のほとんどは活発に DNA 合成をしていなかったのかもしれない。また、浮泥試料の PCR 増幅産物量が相対的に多かったことから (data not shown)、浮泥細菌群集の潜在的な有機物利用能力が高いこと、つまり、海水混合期において水中の有機物消費に貢献し得ることが示唆された。

水温およびクロロフィル *a* 濃度の変動より、本海域において季節的な変化が見られたにもかかわらず、BrdU 標識 DNA (つまり増殖細菌群) の DGGE バンドパターンはあまり変化していなかった。これまでの研究でも、沿岸域においては海域が変わったとしても、増殖細菌群は似たような群集構造をとることが示されている (Hamasaki *et al.* 2007)。沿岸域のような富栄養海域では、季節的な変動にかかわらず、細菌の栄養となる有機物が潤沢にあり、増殖細菌群も影響を受けていることを示唆している。本研究海域においても、定常的に餌や排泄物等が供給されていることから、増殖細菌群の構造に大きな変動はなかったことが推測される。

本研究において特定した増殖細菌群 16 ファイロタイプのうち 8 ファイロタイプはロゼオバクテラクレードに近縁であった。ロゼオバクテラクレードの細菌には、その二次代謝

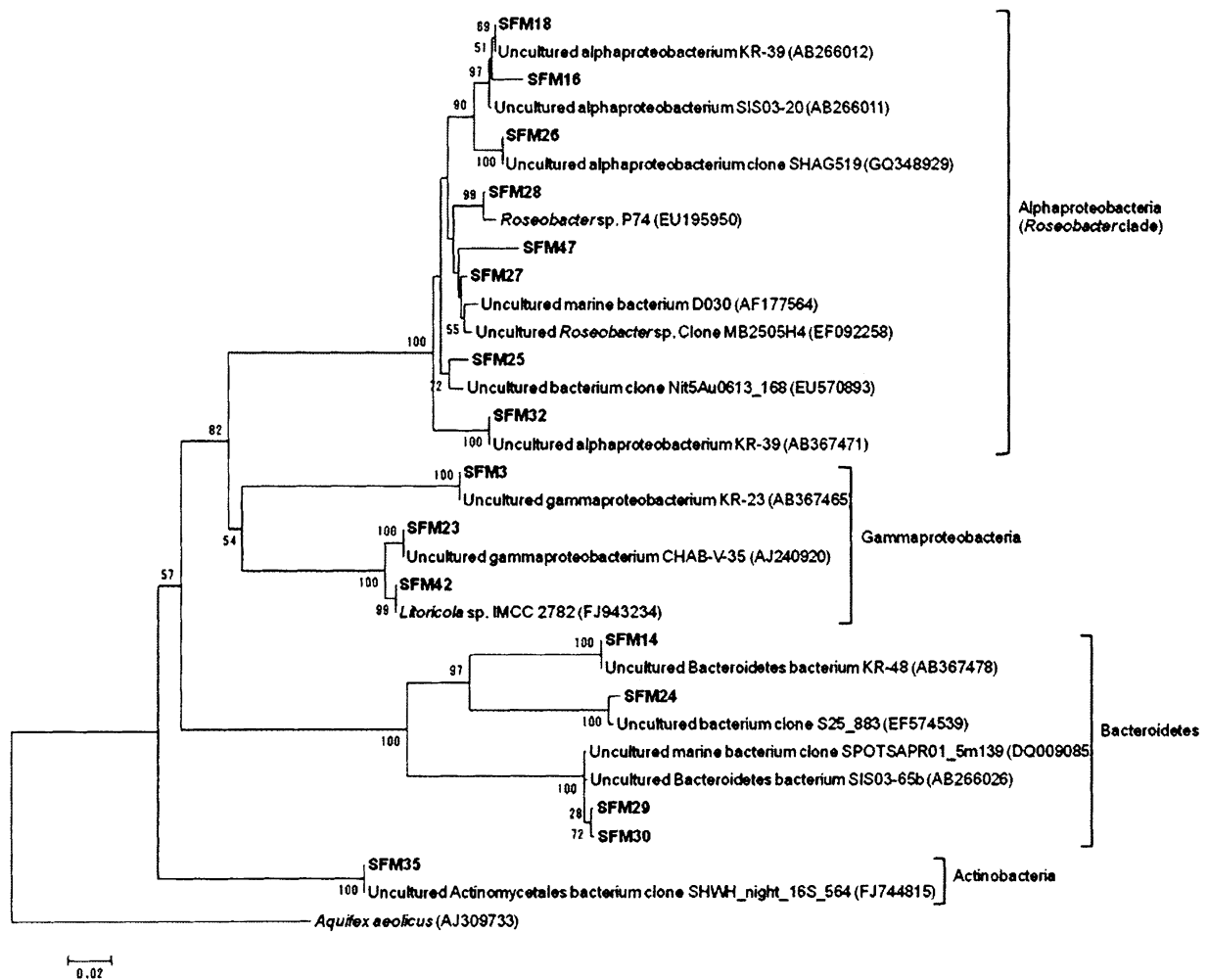


Fig. 2 増殖細菌群の 16S rRNA 遺伝子に基づいた近隣接合法による系統樹。太字が本研究において特定したファイロタイプで、枝の数字は 50%以上のブートストラップ値を示している。*Aquifex aeolicus* はアウトグループ。

産物が仔魚の病原菌に対しプロバイオティクス効果を持つ細菌がいることが示唆されている (Buchan *et al.*, 2005)。本研究において特定されたロゼオバクターに近縁であったファイロタイプの中にも、このような効果を持つ細菌がいるかもしれない。

増殖細菌群 5 ファイロタイプは、これまで養殖場環境とは全く異なる沿岸域において活発に増殖している細菌と最も近縁であった (Hamasaki *et al.*, 2007)。このことは、沿岸域における増殖細菌群は、有機物が潤沢にあるような環境条件に、特に適応した細菌群であることを示唆してい

る。

今後これら細菌に焦点を当てた定量的解析手法 (Fluorescence *in situ* hybridization 法や定量 PCR 法)、あるいは培養法を試み、その性状を明らかにすることで、養殖場水域における細菌群の自浄能力などの役割について詳しい情報を得ることができよう。

参考文献

F. Azam (1999) Microbial control of oceanic carbon flux: The plot thickens, *Science*, 280,

694-696

A. Taniguchi, K. Hamasaki (2008) Community structures of actively growing bacteria shift along a north-south transect in the western North Pacific, *Environmental Microbiology*, 10, 1007-1017

寺西聡子、谷口亮人、浜崎恒二、菊池知彦 (2008)相模湾西部沿岸域における従属栄養性細菌の時空間変動解析 特にその生産力と群集構造について、日本海洋学会春季大会

K. Hamasaki, A. Taniguchi, Y. Tada, R.A., Long, F. Azam (2007) Actively growing bacteria in the Inland Sea of Japan, identified by combined bromodeoxyuridine immunocapture and denaturing gel electrophoresis, *Applied and Environmental Microbiology*, 73, 2787-2798

A. Buchan, J.M. Gonzalez, M.A. Moran (2005) Overview of the marine *Roseobacter* Lineage, *Applied and Environmental Microbiology*, 71, 5665-5677.