

残餌由来のアンモニア処理に寄与する細菌に関する 基礎的研究

Basic Research on Bacteria Contributing to the Disposal of Ammonia Generated by Residual Feed

白石祐彰* 大谷 明** 小河篤史*** 黒瀬英俊** 羽瀨博臣***

要 旨

水産物の閉鎖循環式陸上養殖では、飼育水中の有害なアンモニアを処理しなければならない。このアンモニアの除去には、生物学的廃水処理が行われることが多いものの、この処理プロセスを担っている微生物の挙動や群集構造についての具体的な解析はほとんど行われていない。そこで本研究では、水槽への酸素供給にナノバブル装置を用いて、微細な気泡が常時水中に存在する環境下における、残餌由来のアンモニア態窒素濃度の減少に寄与する細菌叢を調べるため、水槽の水のろ過残渣から細菌の DNA を抽出して、次世代シーケンサーを用いた DNA の塩基配列解析を実施し、優占していた菌種の特特定を試みた。その結果、アンモニア態窒素の大部分は、好気性細菌によりアミノ酸を合成するための同化に利用されたと推察された。また、水槽の水から培養したバチルス属細菌と酵母菌の特性から適性が見込まれる分離株を特定した。

キーワード：閉鎖循環式陸上養殖、アンモニア態窒素、ナノバブル装置、同化、好気性細菌

1. まえがき

沿岸漁業による水揚げ量は年々減少している一方、養殖による魚類生産が年々増えてきている。魚類養殖には、海面を利用する海面養殖と陸上で実施する陸上養殖がある。

陸上養殖は、飼育するための大規模な水槽やろ過システムの設置が必要であることから、大きな初期投資が必要となること、生物ろ過を行うための大量のろ材の洗浄に労力を要することなどの欠点がある。しかし、陸上で作業ができて運営が容易となる点、天候や赤潮等の外的要因を排除できる点など、海面養殖の問題点を解決できるといった大きな長所がある。

従来の閉鎖循環式陸上養殖システムは、魚から排出される糞や鱗等を飼育水から取り出すための物理濾過槽、魚にとって有害なアンモニアを微生物を利用して毒性の低い硝酸に変換する（硝化作用）ための生物濾過槽、蓄積する窒素成分を除去するための脱窒槽、飼育水槽中のタンパク質等を除去するための泡沫処理装置等、多くの装置を適直接続することで、陸上での海水魚の飼育を可能としてきた¹⁾。

飼育水への酸素供給は、一般的にはエアーポンプで空

気の圧力を高め、エアーストーンで水中に空気を送り込む方式が使われている。一方、筆者らは、閉鎖循環式陸上養殖システムに、エアーポンプの代わりに、ナノバブル装置の適用を検討している。ナノバブルは、直径が数十ナノ～数百ナノ（nm）程度の微細な気泡で、水中で数週間から数ヶ月程度の寿命を持つことが知られている²⁾。ナノバブルでの酸素供給により、水中の溶存酸素濃度を効率的に上げることで、水質の改善および水産生物の品質の向上を期待している。

閉鎖循環式陸上養殖の水浄化では、水中に浮遊あるいは沈殿している有機懸濁物の除去と、水に溶解している毒性の強いアンモニア態窒素の除去が重要となる。残餌は時間が経つと細菌により分解され、アンモニア態窒素が溶出する。給餌した餌に含まれる窒素の35%以上が、アンモニア態窒素となって飼育水中に溶出すると試算されている³⁾。

本研究では、閉鎖型陸上養殖の水浄化において課題となる残餌由来のアンモニア処理に関しての基礎研究として、まずはナノバブルの微細な気泡が常時水中に存在する環境下におけるアンモニア処理に寄与する細菌叢の時間的変化の把握、そして、アンモニア処理に寄与する細菌の培養に関する実験を行った。

*技術本部技術研究所環境研究グループ **投資開発事業本部新事業開発部

***土木本部土木部環境技術室

2. 細菌叢把握のための分子生物学的手法の適用

水圏の窒素循環を表す模式図を図-1に示す⁴⁾。NH₄⁺ (アンモニア) から有機態N (窒素) へ変換する同化、NH₄⁺から N₂ (窒素ガス) へ変換するアナモックス、NH₄⁺から NO₂⁻ (亜硝酸) を経て NO₃⁻ (硝酸) へ変換する硝化作用のいずれか、または同時に行われることで、飼育水中のアンモニア態窒素が除去される。

従来、生物学的廃水処理プロセスにおいては、反応槽をブラックボックスとして扱い、処理を行っている微生物の挙動や群集構造については具体的な解析がほとんど行われておらず、廃水の入力・出力操作などにより運転条件を決定していた⁵⁾。微生物の検出方法として、ある栄養素を含んだ寒天培地にサンプルを塗布し、そこに生育したコロニーの数で、対象とするサンプルに生息する微生物の数を推定する方法 (培養法) が広く採用されてきた。しかし、培養可能な微生物は、実際に環境や廃水処理装置内に存在する微生物のせいぜい10%程度といわれており、残りの90%以上の微生物は、生きてはいるが培養できないことになる。したがって、培養可能な微生物だけを対象とした研究では、廃水処理装置の性能 (処理水質) と微生物の関係を正しく把握することは不可能である⁶⁾。

しかし近年、分子生物学的手法の環境微生物学研究への導入により、培養することなく細菌群集を解析できる方法が開発され、従来の培養法では検出できない細菌種が自然界には多く存在することが報告されている⁷⁾。また、1990年代より構築されてきた細菌の16Sリボゾーム (16S r) RNA 遺伝子の塩基配列のデータベースを有効に利用した手法が、微生物の迅速、かつ正確な分類同定に有効であることが証明された⁸⁾。16S rRNA 遺伝子を利用する長所としては、

- i. 生命の維持に欠くことのできない必須遺伝子であるため、すべての細菌が有している

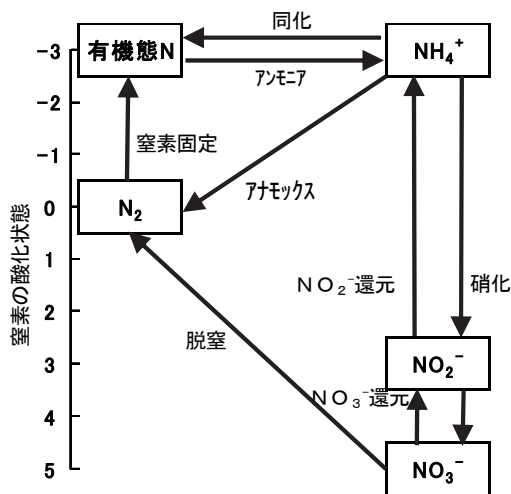


図-1 水圏の窒素循環を表す模式図

- ii. 塩基配列中に共通する領域が比較的多く、系統間で比較することが可能である
- iii. データベースが充実していることなどがあげられる⁹⁾。

そこで、水槽中の細菌を網羅的に解析することで、飼育水中の残餌由来によるアンモニア態窒素が、同化、アナモックス、硝化のいずれの作用により減少したのかを推定することができると考えた。

3. 水槽中のアンモニア態窒素の動態に関する実験

3.1 目的

残餌からアンモニア態窒素が溶出する挙動、および水槽中でナノバブル装置を運転しているときにアンモニア態窒素濃度がどのような変化を示すかを調べるための実験を行った。

3.2 実験方法

500L 水槽 (外径: 1,170mm、高さ: 760mm) の底に、セラミック製の多孔質担体 (粒サイズ: 15×15mm、微生物定着有効面積 400m²/L) 12.5 kg を敷き、トラフグを飼育している水槽の、種々雑多な細菌が存在していると考えられる逆洗水 (ろ過方向とは逆に水を流すことにより、汚れをろ材から剥離させた水) を入れた。水槽の底に敷いた多孔質担体を写真-1に、トラフグを飼育している水槽を写真-2に、逆洗水を入れた水槽を写真-3に示す。水槽中でナノバブル装置 (エアータン: 2~5L/min) を運転し、残餌に似せた泥状にした餌を 10g 投入した。



写真-1 水槽の底に敷いた多孔質担体



写真-2 トラフグを飼育している水槽

餌の主原料は、魚粉、オキアミミール、エビミールで、動物質性原料76%である。主成分を表-1に示す。アンモニア態窒素濃度は、ポータブル吸光光度計を用いてサリチル酸法で測定した。

飼育水のアンモニア態窒素濃度が 0.5mg/L を下回った段階で、泥状にした餌 10g または 30g を投入する実験を 50 日間実施した。

3.3 実験結果

餌を投入した翌日にはアンモニア態窒素濃度は上昇するが、その後細菌の働きで低下することを確認した。水槽中のアンモニア態窒素の経日変化と水槽への餌の投入時期を図-2に示す。

500L 水槽の底にあった多孔質担体には細菌が定着していることから、水槽から取り出し、風乾した。

4. アンモニア処理に寄与する細菌に関する実験

4.1 目的

微細な気泡が常時水中に存在する環境下において、水槽中の細菌を網羅的に解析することで、飼育水中の残餌由来によるアンモニア態窒素が同化、アナモックス、硝化のいずれの作用により減少したのかを推定するための実験を行った。

4.2 実験方法

2000L 水槽（外径：1950 mm、高さ：900 mm）の底に、セラミック製の多孔質担体 37.5kg を敷き、その上に3章の実験で細菌が定着した 12.5 kg の多孔質担体を敷いた（写真-4）。人工海水 2000L を入れ、ナノバブル装置（エアータ出量：10~15L/min）を運転した（写真-5）。フグなどの飼育水と同様に、このときの人工海水の塩分濃度は1%とした。泥状にした餌を37.8g投入し、アンモニア態窒素濃度を測定した。餌を投入した直後にアンモニア態窒素濃度は上昇するが、数日後には減少した（図-3）。実験開始から6週を過ぎたころから目詰まりによりナノバブル装置のエアータ出量が減少したが、アンモニア態窒素濃度の上昇および減少の挙動は、図-2と同様の傾向を示した。アンモニア態窒素濃度が0.2mg/Lを下回った段階で、餌を100gまたは200g投入し、実験開始から2週後、6週後および10週後に採水した。

採水した試料をメンブレンフィルター（ポアサイズ：0.22 μm）でろ過して試料中の細菌を捕集し、DNAを抽出した。DNAの16S rRNA領域をPCRで増幅し、次世代シーケンサーを用いて塩基配列解析を行い、得られた配列を既知の16S rRNA遺伝子のデータベース（SILVA database, SSU_v132）と比較することで、菌種の推定を行った。次に、リアルタイムPCR法による細菌数測定を実施した。最近縁種は、相同性検索プログラムを用いて同定した。

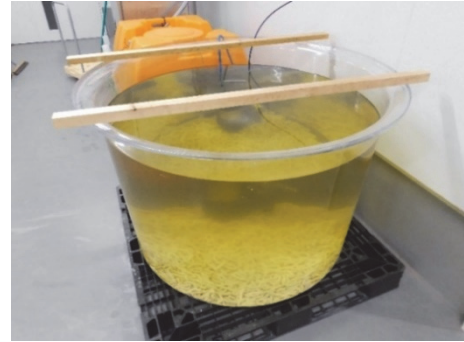


写真-3 逆洗水を入れた水槽

表-1 餌の主成分

成分	割合
粗蛋白質	52.0%以上
粗脂肪	8.0%以上
粗灰分	16.0%以下
カルシウム	2.0%以上
粗繊維	2.0%以下
りん	1.5%以上

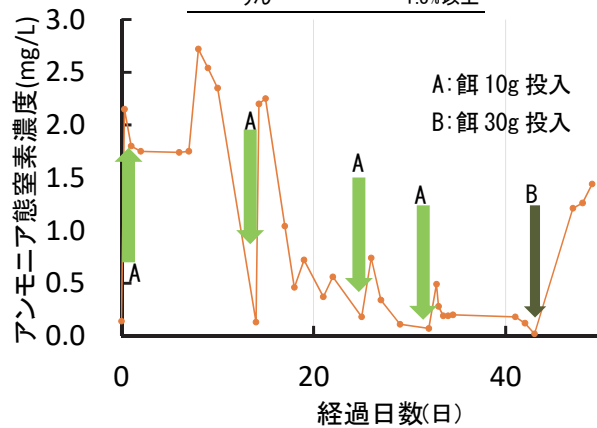


図-2 アンモニア態窒素の経日変化と餌の投入時期



写真-4 新品の上に敷いた細菌が定着した多孔質担体

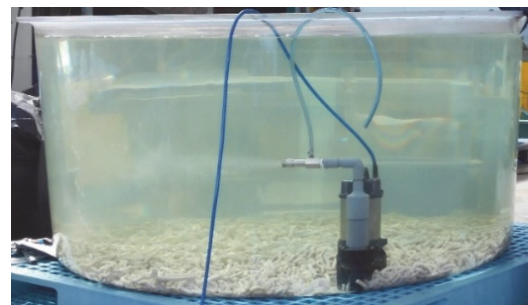


写真-5 水槽中の人工海水とナノバブル装置

4.3 実験結果および考察

2 週後、6 週後および 10 週後の各試料において、存在割合が 1%以上であった属レベル（一部、科レベル）の細菌とその存在割合を図-4 に示す。2 週後試料では 21 種類、6 週後試料では 19 種類、10 週後試料では 18 種類の細菌が存在割合 1%以上であったが、すべての試料で存在していたのは、*Roseivirga* 属、*Muricauda* 属、*Sphingobacteriales* 属、*Magnetospira* 属、*Thalassobaculum* 属、*Pseudohongiella* 属、*Planctomycetes* 門の 7 種類であった。図-4 から、時間経過にもない細菌叢の組成が変化したことが分かる。代表的な硝化細菌である *Nitrosospira* 属、*Nitrosomonas* 属、*Nitrosococcus* 属、*Nitrosovibrio* 属、*Nitrobacter* 属、*Nitrococcus* 属、*Nitrospina* 属、*Nitrotoga* 属が存在しなかったことから、硝化によるアンモニア態窒素の減少がなかったと推定された。また、*Planctomycetes* 門が存在したことから、アナモックスによってアンモニア態窒素が減少した可能性が示された。しかし、*Planctomycetes* 門の存在割合は全体の 5%にも満たなかったことから、大部分のアンモニア態窒素の減少は同化により行われたと推定した。

リアルタイム PCR による定量結果から存在量 (copies/mL) を算出した。10 週後試料で存在量が大きかった細菌を表-2 に示す。これらの細菌は、酸素要求性および炭素利用性から、化学合成従属栄養細菌と推定された。化学合成従属栄養細菌は、アンモニア態窒素をアミノ酸合成のための同化に利用する。

以上の結果から、2000L 水槽にエアータンが 10~15L/min のナノバブル装置を 1 台設置するという条件下において、水槽中のアンモニア態窒素は、それを同化する細菌により主に処理されることが推察された。

5. *Bacillus* (バチルス) 属と酵母菌の分離株の特定

5.1 分離培養の目的

バチルス属細菌および酵母菌は化学合成従属栄養細菌なので、アンモニア態窒素を同化することが期待できる。自然界に存在する数多くの種類のバチルス属細菌の中には、高濃度の有機物を短時間で分解できる、廃水処理の

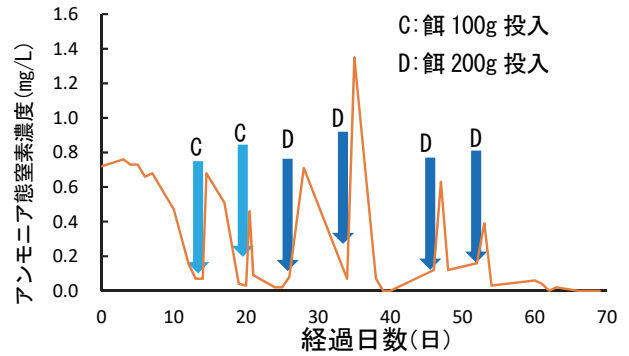


図-3 アンモニア態窒素の経日変化と餌の投入時期

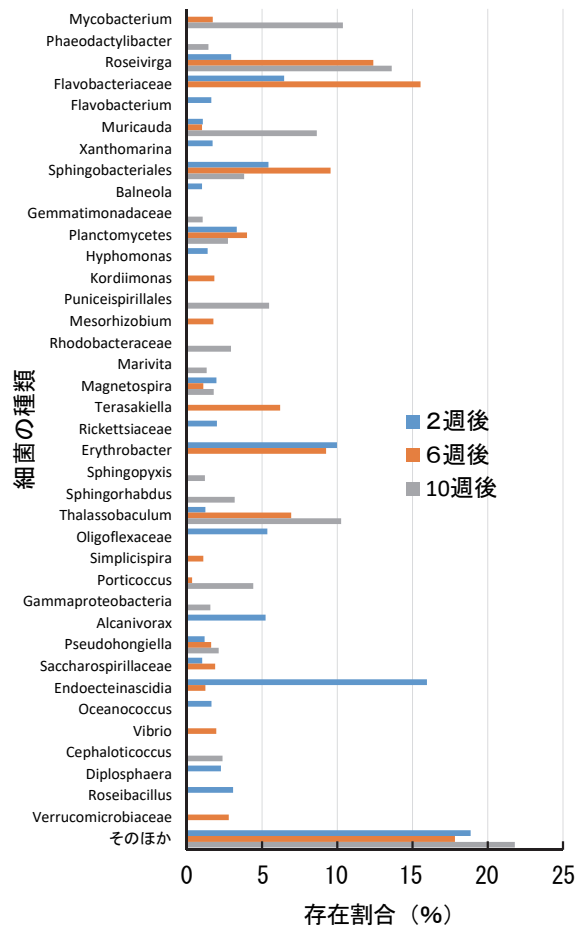


図-4 各試料における細菌の存在割合

表-2 10 週後試料で存在量が大きかった細菌

最近縁種	存在量 (copies/mL)	酸素要求性	至適NaCl濃度	炭素利用性
<i>Roseivirga seohaensis</i> subsp. aquiponti strain D-25	8.7×10^5	偏性好気性	9%未満	カザミノ酸、ペプトン、トリプトン
<i>Thalassobaculum fulvum</i> strain HSF7	6.6×10^5	好気性	0-10%	糖類
<i>Muricauda zhangzhouensis</i> strain 12C25	5.5×10^5	偏性好気性	2%	主に糖・有機酸
<i>Mycolicibacterium litoralei</i> NIIDNTM18	5.2×10^5	好気性	5%未満	LB 培地、TSA 培地、ソートン培地で増殖
<i>Limimanicola hongkongensis</i> strain UST950701-009P	3.5×10^5	偏性好気性	2-14%	炭水化物

浄化能力が高いバチルス属細菌が存在する¹⁰⁾。バチルス属細菌は、枯草・稲ワラ・落ち葉・堆肥・塵や淡水・海水など自然界に広く分布している。この菌は、酸素を好む好気性細菌で、10°C～65°Cの温度、弱酸性 (pH4) ～弱アルカリ性 (pH9) の環境でも活動することができる。

一方、酵母菌を用いた廃水処理技術の研究が、欧米や新興国などにおいて盛んとなっており、対象となる廃水の種類の幅が広がっている¹¹⁾。酵母菌は、土壌、海水・淡水、高等植物の果実・花・茎・葉の表面、広葉樹幹の傷口より溢出する樹液中、高等動物の体の内外ならびに排泄物などに存在し、繁殖する。

微細な気泡が常時水中に存在する環境下の飼育水へ、バチルス属細菌および酵母菌を投入することによりアンモニア態窒素を同化したいと考え、4章の実験で用いた2000L 水槽の水 (試料水) からバチルス細菌と酵母菌の分離培養を試み、培養した菌種の特徴から適性が見込まれる分離株を特定した。また、分離株の DNA 塩基配列から菌種の同定を図った。

5.2 培養方法および結果

a. バチルス属細菌

試料水を 65°C、30 分間加温して急冷後、段階希釈した。原液および各段階希釈液 0.1mL を、それぞれ NaCl 3.5%添加標準寒天平板培地に塗抹して、30°Cで 3～5 日間培養した。

b. 酵母菌

試料水をバチルス属細菌と同様の方法で段階希釈した後、原液および各段階希釈液 0.1mL を、それぞれクロラムフェニコール 100ppm および NaCl 3.5%添加 PDA 平板培地に塗抹し、25°Cで 3～5 日間培養した。

検出されたコロニー (菌の塊) のうち、外観の異なるコロニーを、バチルス属細菌は 3 種類、酵母菌は 2 種類それぞれ選択した。それらを分離培養した結果を表-3 に示す。

5.3 DNA 塩基配列による菌種の同定

分離株を純粋培養した後、バチルス属細菌は 16S rDNA (16S rRNA 遺伝子) の上流部 5'端から約 500bp の塩基配列を、酵母菌は rRNA をコードする (特定のタンパク質を作るための情報を持つ) 遺伝子の部分塩基配列 (LSU rRNA 遺伝子の D2 領域) を、それぞれ DNA シーケンサーにより決定した。得られた塩基配列をもと

に、国際塩基配列データベース (DDBJ ほか) などで検索、照合し、分離株について相同率 (塩基配列の類似度) の高い菌種を表-4 のように同定した。酵母菌の場合、絶対的ではないが、塩基配列の相同率 99%以上が同定の目安とされている⁷⁾。ただし、相同値が何%以上であれば同種と同定し、何%以下なら新種なのかという問いに対して明確な回答はない¹²⁾。

バチルス属細菌の特徴を表-5 に、酵母菌の特徴を表-6 に示す。

5.4 分離株の特定

分離株 A～E のうち、分離株 C は通性嫌気性で、分離株 D は硝酸塩窒化性がなかった。通性嫌気性菌の中には、酸素存在下でも発酵しかせず、増殖や活動が抑えられるものもあるので分離株 C は除外した。また、飼育水槽内では硝酸が存在するので、硝酸塩窒化性を有する方が望ましい。そのため、*Cytobacillus horneckiae* (分離株 A)、*Cytobacillus solani* (分離株 B) および *Sampaiozyma vanillica* (分離株 E) を飼育水槽への投入株として選択した。

表-3 分離培養結果

対象	分離株	菌数/mL	外観
バチルス属細菌	A	4.5×10 ²	淡茶色、中コロニー
	B	1.4×10 ²	淡茶色、小コロニー
	C	1×10 ¹	暗黄色、中コロニー
酵母菌	D	1×10 ¹	ピンク色、小コロニー
	E	1×10 ¹	灰白色、小コロニー

表-4 各分離株の同定試験結果

分離株	菌種	相同率 (%)
A	<i>Cytobacillus horneckiae</i>	96.9
B	<i>Cytobacillus solani</i>	98.0
C	<i>Sutcliffiella horikoshii</i>	99.0
D	<i>Cystobasidium minutum</i>	99.4
E	<i>Sampaiozyma vanillica</i>	99.6

表-5 バチルス属細菌の特徴

分離株	酸素要求性	至適生育温度	生育温度	至適生育pH	NaCl濃度	コロニー	備考
A	好気性	30°C	5～50°C	7.0	10%	黄色味を帯びている	一般に空気中、土壌などから分離
B	好気性	35°C	20～45°C	9.0	0～10%	淡いオレンジ色	一般に土壌から分離
C	通性嫌気性	—	10～40°C	8.0	8～9%	小さくクリームホワイト色	一般に土壌から分離

表-6 酵母菌の特徴

分離株	硝酸塩窒化性	コロニー	備考
D	なし	ピンク色のバター状およびスムーズ型	自然界に広く分布し、空中、海水、深海、淡水、植物、動物などから分離
E	あり	クリーム色のムコイド状	一般に汚水、葉面から分離

6. まとめ

微細な気泡が常時水中に存在する環境下において、残餌がある水槽内で細菌叢にどのような変化が起こるのかを調べるために、水槽中の細菌を網羅的に解析した。その結果、2000L水槽にエアータンが吐出量が10~15L/minのナノバブル装置を1台設置した条件下において、アンモニア態窒素の一部はアナモックスによって処理されているが、大部分はアミノ酸を合成するための同化に利用されることが推察された。

また、2000L水槽の試料水から、アンモニア態窒素を同化することが期待できる2種類のバチルス属細菌と1種類の酵母菌を分離培養できた。

7. あとがき

現在、当社では閉鎖型陸上養殖の事業化に向け20000L水槽を2基設置し(写真-6)、硬骨魚類(トラフグ)を400匹ずつ飼育している。本実験での2000L水槽中の有機懸濁物は泥状の餌だけであったが、20000L水槽では、さらに糞や鱗、体表粘液などが加わる。今後は、エアータンに代わり、ナノバブル装置を適用して、トラフグを飼育している水槽中の細菌について網羅的な解析を経時的に実施し、環境要因の違いによるアンモニア処理に寄与する細菌の優占種とその生理生態を比較してデータを蓄積することで、微細な気泡が常時水中に存在する効果について検証したいと考えている。

また、分離培養したバチルス属細菌および酵母菌は、-80℃で保管しており、ナノバブル装置を運転してトラフグを飼育する水槽に投与する実験を計画している。



写真-6 実験棟内にある2基の20000L水槽

【参考文献】

- 1) 大脇博樹、山本純弘、岡本 昭、黒川由美、「海水魚の閉鎖循環型大規模陸上飼育システムの構築」、長崎県工業技術センター研究報告、Vol.40、pp.52-55、2011
- 2) 柘植秀樹、「マイクロ/ナノバブルの基礎」、日本マリンエンジニアリング学会誌、Vol.46、No.6、pp.4-10、2011
- 3) 山本義久、「水産増養殖での閉鎖循環飼育システムの展開」、日本海水学会誌、Vol.69、No.4、pp.225-237、2015
- 4) 濱崎恒二、木暮一啓、「水圏微生物の基礎」、恒星社厚生閣、p.187、2015
- 5) 常田 聡、平田 彰、稲森悠平、「耐塩性を有する硝化・脱窒細菌の獲得と産業廃水処理への適用」、公益財団法人 ソルト・サイエンス研究財団 研究報告書、pp.161-169、2005
- 6) 赤司 昭、「分子生物学的手法を用いた水処理装置の微生物診断技術」、神鋼パンテック技報、Vol.45、No.2、pp.10-15、2001
- 7) 杉田治男、坂元美智子、来間明子、土谷知弓、「キンギョ養魚池の底泥中における優占細菌群集」、水産増殖、Vol.65、No.3、pp.255-257、2017
- 8) 渡辺幸一、「腸内フローラの分子生物学的解析法の応用と課題」、腸内細菌学雑誌、Vol.21、No.3、pp.199-208、2007
- 9) 後藤慶一、「DNA 塩基配列を用いたカビ・酵母の同定」、モダンメディア、Vol.55、No.9、2009
- 10) 田口和之、佐藤匡則、花井洋輔、「バチルス菌による新排水処理ソリューション」、富士電機技報、Vol.90、No.1、pp.47-51、2017
- 11) 渡部貴志、家藤治幸、「酵母を用いた排水処理法による効率的なリン除去の検討」、日本醸造協会誌、Vol.106、No.5、pp.280-286、2011
- 12) 浜田 盛之、鈴木 健一朗、「何から始めよう 微生物の同定 細菌・アーキア編」生物工学会誌、Vol.89、No.12、pp.744-747、2011