

水耕栽培システム中の細菌叢の変遷

メタデータ	言語: ja 出版者: 公開日: 2022-02-01 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 一條, 知昭 メールアドレス: 所属:
URL	https://osaka-shoin.repo.nii.ac.jp/records/4819

水耕栽培システム中の細菌叢の変遷

健康栄養学部 健康栄養学科 一條 知昭

要旨：水耕栽培システムにおける微生物の生理活性も含めた全体像を明らかとし、衛生微生物学的な安全を保証するための管理手法の提言に向けた基盤的知見の構築を行うことを最終目的とし、本研究では水耕栽培システムにおける細菌の全体像を明らかとすることを目指した。市販の小型水耕栽培システムを利用して、環境の異なる 3 条件下でレタスを栽培し、養液中に存在する細菌を 1 週間ごとに 4 週間まで回収し、細菌の 16S rRNA 遺伝子を指標としたアンプリコンシーケンスを行い、栽培期間中の細菌叢の変遷を明らかとした。細菌数はいずれのサンプルにおいても栽培期間に伴い増加し、4 週間目に最も多くなった。細菌叢は、栽培環境の違いにより大きく異なり、栽培条件が養液中の細菌叢に影響を与えることが示唆された。細菌叢の大部分を占める *Sphingomonas* 属、*Sphingopyxis* 属、*Terrabacter* 属の細菌は土壌に由来する細菌であり、種子に付着していたものが、養液中で増殖したと推測された。

キーワード：水耕栽培、細菌モニタリング、アンプリコンシーケンス、16S rRNA 遺伝子

1. 背景

市中のレストラン、病院や家庭などにおいて、小型の水耕栽培装置が普及しつつある。レストランにおいては、清浄な環境で育てられた野菜として消費者に提供され、病院では、病院食への活用のみならず、植物による癒しの効果やコミュニケーションの創出の場として期待されている。大規模な植物工場においては、一定の基準で管理されており、微生物の衛生管理も適切に行われていることも多い。一方、上記のような、身の回りの水耕栽培システムにおいては、適切に管理がなされているとは言い難い。水耕栽培は、従来の土耕栽培と比べて手軽に実施することができる。土耕栽培では、土を使用する栽培方法であり、その生育環境の微生物学的安全性は生育の場である土に依存すると考えられる。1 グラムの土壌の中には 10^{10} cell 以上の細菌が存在し、また多様性が非常に高いことが先行研究により示されている^{1), 2)}。そこには強固な微生物生態系が存在しており、高い微生物学的緩衝能力を持っている。すなわち、緩衝能力の範囲内であれば、外来の微生物の侵入があった場合でも元の状態に戻ることが可能である。一方、水耕栽培においては、養液中にフザリウム (*Fusarium*) 菌などの植物病原細菌が短時間のうちに拡がってしまう問題が多く報告されている。これは土壌と比べて水耕栽培養液中では微生物の多様性が低いために、ある特定種の細菌の増殖が起こった

場合に、その増殖を抑制する作用が働きにくいことに起因していると考えられる。したがって、水耕栽培における養液の微生物管理が不十分であった場合、大規模な感染症が発生する危険性があるため、水耕栽培養液中の微生物の動態解析は極めて重要な課題であるといえる。

微生物学的に安全・安心に水耕栽培を楽しむためには、養液をはじめとする水耕栽培システムの衛生微生物学的安全性を保証する必要がある。すなわち、システム中に存在する微生物を高精度・高感度に定量し、その属種を明らかにすることで微生物の全体像を理解する。そして、適切に微生物管理を行うことが重要である。現在、細菌の定量や同定には一般的に培養法が用いられている。培養法は簡便な方法であり、操作に特殊な技術を必要としない特長があるが、水環境中に生息する細菌の 90% 以上が通常の培養法では検出できないことがこの 30 数年間の環境微生物学の進展により明らかになってきている³⁻⁶⁾。

そこで本研究では、16S rRNA 遺伝子を標的としたアンプリコンシーケンス法により水耕栽培システムにおける微生物の全体像を明らかとし、また運用中の変遷を解明することにより、衛生微生物学的な安全を保証するための知的基盤の構築を目指した。

表 1 水耕栽培の環境条件

	設置場所	培養液	レタス栽培
Sample #1	室内	液体肥料	なし
Sample #2	室内	液体肥料	あり
Sample #3	室内	滅菌水	あり
Sample #4	クリーンベンチ内	液体肥料	なし
Sample #5	クリーンベンチ内	液体肥料	あり

2. 材料と方法

水耕栽培方法

小型水耕栽培システム（UH-A01E1；株式会社ユーイング）を5台使用し、室温（約23℃）下でレタスを種子から栽培した。また、栽培液にはろ過滅菌した市販の液体肥料を、コントロールの系では滅菌水を用いた。5台のシステムでの栽培は表1のように、環境条件を変えて行った（図1）。



図 1 水耕栽培システム

水耕栽培液のサンプリング

栽培開始0日目から1週間おきに4週間目まで、100 mL ずつ水耕栽培液をサンプリングした。なおレタスは4週間で収穫できるサイズまで生育した。

水耕栽培液中の細菌からの DNA 抽出

100 mL の試料に含まれる細菌を MicroFunnel with Super 0.2μm（日本ボール）を用いて、孔径 0.2 μm のメンブレンフィルター上に捕集した。捕集した細菌からの DNA 抽出には DNeasy PowerWater Kit（キアゲン）を用い、キットの標準的なプロトコルに従って DNA を抽出した。抽出した DNA はそれぞれ -20℃ で保管した。

16S rRNA 遺伝子を標的としたアンプリコンシーケンス

16S Barcoding Kit 1-24（Oxford Nanopore Technologies）のプロトコルに従い、LongAmp Taq

DNA ポリメラーゼ（New England Biolabs）を使用し、16S rRNA 遺伝子の全長を増幅し、ライブラリを調整した。調整したライブラリは、Flongle フローセル（Oxford Nanopore Technologies）にアプライし、MinION（Oxford Nanopore Technologies）上で塩基配列解析を行なった。

シーケンスデータの解析

シーケンスデータ解析は以下のように行った。MinKNOW ソフトウェア（Oxford Nanopore Technologies）を用いて取得したリードをベースコールしたのち、リードの FASTQ ファイルを問い合わせ配列とし、EPI2ME（Oxford Nanopore Technologies）の FASTA バイブラインを用いて系統解析を行なった。

多様性解析

試料中の細菌の多様性を評価するために、得られた系統データをもとに多様性解析を行なった。多様性指数には Shannon-Weaver diversity index を採用し、Microsoft Excel で算出した。

3. 結果と考察

本研究では、水耕栽培液中に存在する細菌の動態を、培養に依存しない細菌モニタリング法を用いて解析した。

栽培中、コントロールとして使用したレタスを栽培しない系（Sample #1、#4）では、細菌由来の DNA が十分量抽出できず、栽培液中への細菌の混入および養液中での増殖が見られなかったと推測された。一方、それ以外の栽培系（Sample #2、#3、#5）では、解析に十分量の DNA が抽出できたことから、レタス栽培にともなって養液中に細菌が混入し、増殖した可能性が考えられた。抽出した DNA をもとに、試料中の細菌叢を解析したところ、図2に示す結果が得られた。

図2より、栽培環境の違い（Sample #2、#3、#5）により細菌叢は大きく異なり、Sample #2および

Sample #5 では *Sphingomonas* 属、*Terrabacter* 属が優占し、Sample #3 では *Sphingopyxis* 属が優占した。クリーンベンチ内での栽培であり、外部からの細菌の混入が制限された系である Sample #5 で細菌が検出されたこと、またそれぞれの系で優占していた解析にあたり、十分なリードが得られた試料のみを記載した。

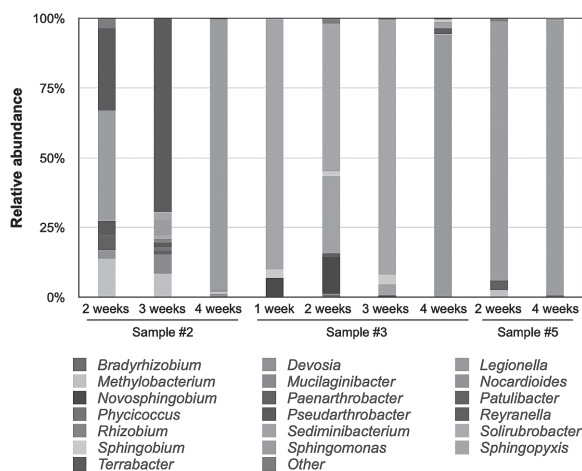


図2 水耕栽培期間中の細菌叢の変遷

Sphingomonas 属、*Sphingopyxis* 属、*Terrabacter* 属は土壌に由来する細菌であることから、種子に付着していた細菌が、養液中で増殖したと推測された⁷⁻⁹⁾。さらに、栽培液に液体肥料を用いた Sample #2、#5 と滅菌水を用いて栽培した Sample #3 では優占種が大きく異なった。このことから、種子に付着していた細菌のうち、生育環境（栽培液）に適した細菌のみが選択され増殖することが考えられた。

次に、細菌叢の多様性解析でしばしば用いられる Shannon-Weaver diversity index をもとに、多様性の変遷について解析した。多様性の変遷を図3に示した。

Sample #2 と Sample #3 は2週間目に、Sample #5 は3週間目に多様性指数は最大となり、最も細菌が多

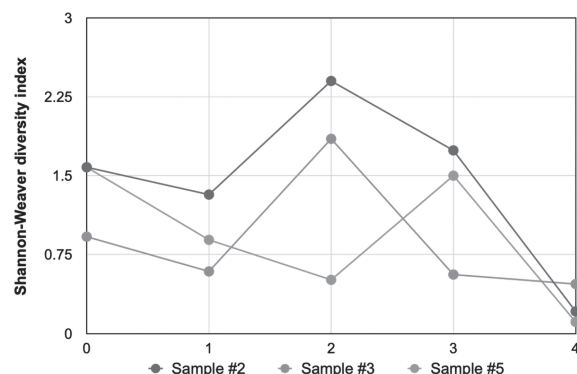


図2 水耕栽培期間中の細菌叢の変遷

様な状態になっていることを示しているが、4週間目になるといずれも栽培期間中で最も多様性が低くなっていることが明らかとなった。すなわち栽培期間中、細菌の多様性には上下はあるものの、栽培が長期化するにつれて栽培液中の細菌の多様性は減少に向かうことが示唆された。

多様性が低い環境において、ある特定種の細菌の増殖が起こった場合に、その増殖を抑制する作用が働きにくいとされている。これは、微生物の多様性が豊富な場合、多種多様な微生物が競合し合うことで、微生物生態系のバランスが保たれるが、微生物の多様性が低く、微生物同士の拮抗作用が働きづらい場合は、特定の微生物だけが增加することがある。実際に、浄水システムにはレジオネラ菌¹⁰⁾や非結核性抗酸菌¹¹⁾などの細菌が存在し、システム管理が不十分な場合には増殖する可能性があることが報告されている。今回の結果は、水耕栽培では栽培が長期にわたるにつれて、微生物の多様性が減少傾向に向かう可能性を示していることから、その影響を最小限にとどめるためにも、栽培液は定期的に換水し、常に清浄な状態を保つことが重要である。

本研究では、16S rRNA 遺伝子を指標としたアンプリコンシーケンス法を用いることにより、水耕栽培液中の細菌の全体像、そして栽培期間におけるその変遷を明らかとした。水耕栽培は植物工場での活用が増えるとともに、手軽に実施することができることから家庭などでの利用も広がっている。得られた知見は、水耕栽培を衛生微生物学的に安全に楽しむために大きく貢献できるものと考えている。

謝辞

本研究は2020年度大阪樟蔭女子大学特別研究助成費により実施した。

参考文献

- 1) Gans J, Wolinsky M, Dunbar J. Computational improvements reveal great bacterial diversity and high metal toxicity in soil. *Science*. 2005 Aug 26; 309 (5739): 1387-90.
- 2) van der Heijden MG, Bardgett RD, van Straalen NM. The unseen majority: soil microbes as drivers of plant diversity and productivity in terrestrial ecosystems. *Ecol Lett*. 2008 Mar; 11 (3): 296-310.
- 3) Rappé MS, Giovannoni SJ. The uncultured

- microbial majority. *Annu Rev Microbiol.* 2003; 57: 369–94.
- 4) Staley JT, Konopka A. Measurement of in situ activities of nonphotosynthetic microorganisms in aquatic and terrestrial habitats. *Annu Rev Microbiol.* 1985; 39: 321–46.
 - 5) Kawai M, Matsutera E, Kanda H, Yamaguchi N, Tani K, Nasu M. 16S ribosomal DNA-based analysis of bacterial diversity in purified water used in pharmaceutical manufacturing processes by PCR and denaturing gradient gel electrophoresis. *Appl Environ Microbiol.* 2002 Feb; 68(2): 699–704.
 - 6) Yamaguchi N, Ichijo T, Sakotani A, Baba T, Nasu M. Global dispersion of bacterial cells on Asian dust. *Sci Rep.* 2012; 2: 525.
 - 7) Sharma M, Khurana H, Singh DN, Negi RK. The genus *Sphingopyxis*: Systematics, ecology, and bioremediation potential-A review. *J Environ Manage.* 2021 Feb 15;280:111744.
 - 8) Won K, Kook M, Yi TH. *Terrabacter koreensis* sp. nov., isolated from soil of a flowerbed. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2014 Oct; 64 (Pt 10): 3335–3340.
 - 9) Jin MF, Quan XT, Siddiqi MZ, Liu QZ, Yu HS, Im WT. *Terrabacter ginsengisoli* sp. nov., isolated from ginseng cultivating soil. *J Microbiol.* 2018 May; 56 (5): 331–336.
 - 10) Fields BS, Benson RF, Besser RE. *Legionella* and Legionnaires' disease: 25 years of investigation. *Clin Microbiol Rev.* 2002 Jul;15 (3): 506–26.
 - 11) Hilborn ED, Covert TC, Yakus MA, Harris SI, Donnelly SF, Rice EW, Toney S, Bailey SA, Stelma GN Jr. Persistence of nontuberculous mycobacteria in a drinking water system after addition of filtration treatment. *Appl Environ Microbiol.* 2006 Sep; 72 (9): 5864–9.

Changes in Bacterial Community Structure in a Hydroponic System

Faculty of Health and Nutrition, Department of Health and Nutrition
Tomoaki ICHIO

Abstract

The objective of this study was to clarify the real microbial world in hydroponic systems, to develop fundamental knowledge for the assurance of microbiological safety in the system. Lettuce was grown under three different environmental conditions using a commercially available hydroponic system. Bacteria present in the nutrient solution were collected every week for up to four weeks, and 16S rRNA gene targeted amplicon sequencing was performed for clarifying the bacterial community structure. The number of bacteria increased with the culture methods in all samples, and was highest at the fourth week. The bacterial community structure differed greatly depending on the cultivation environment, suggesting that the cultivation conditions may affect the bacterial community in the nutrient solution. Bacteria of the genera *Sphingomonas*, *Sphingopyxis*, and *Terrabacter*, which were soil-derived bacteria and were presumed to have been attached to the seeds and multiplied in the nutrient solution.

Keywords: hydroponic system, bacterial monitoring, amplicon sequencing, 16S rRNA gene