

海洋微生物の共生がもたらす耐塩性獲得メカニズムの解明

常田 聡¹, 藤谷 拓嗣², 石井 拳人³

¹早稲田大学先進理工学部生命医科学科, ²産業技術総合研究所バイオメディカル研究部門, ³早稲田大学大学院
先進理工学研究科生命医科学専攻

概要

我が国の製塩プロセスでは鹹水を得るためにイオン交換膜を利用している。イオン交換膜上に海水中の微生物群が付着すると、微生物共同体として知られているバイオフィルムを形成し、電気抵抗の急激な上昇を引き起こす。そこで本研究では、バイオフィルム形成を防止し、イオン交換膜の生物汚染を抑制する方法論を提案するために、海水に棲息する耐塩性微生物の増殖機構の特徴を理解することを目的とした。海水中における個々の耐塩性微生物の生存戦略を調べるためには、微生物を単一種として培養できる状態にある分離株を獲得し、様々な環境条件下での増殖活性を評価することが必須である。本研究室では、海洋沿岸域に生息しているにも関わらず、分離培養すると海水と同じ塩濃度条件下で増殖活性を著しく低下させてしまう耐塩性微生物 *Nitrotoga* を獲得している。この現象は、分離株では海水中で増殖できない微生物でも、異種微生物と共存することで耐塩性を獲得することができることを示唆している。

実験室環境で培養しているフラスコ内では、共存微生物は *Nitrotoga* に付着し凝集体を形成すると考えた。*Nitrotoga* と共存微生物が形成する凝集体を分取するため、サンプルをセルソーター (FACS AriaII; Becton Dickinson) へ供試した。大きさを表す前方散乱光と内部構造の複雑さを表す側方散乱光を指標としてサンプルを解析した。2 種類の散乱光を指標として、*Nitrotoga*-共存微生物の凝集体を 96 ウェルプレート各ウェルへ播種した。96 ウェルプレートで 2 ヶ月間培養し、*Nitrotoga* が増殖したウェルを同定した。実験に必要なバイオマスを確保するため、1 ウェル (150 μL) から 25 mL チューブ、500 mL 瓶へとサンプルをスケールアップした。スケールアップ後培養サンプルをアンブリコン解析したところ、*Nitrotoga* 以外の細菌として *Acidovorax* が優占していたことがわかった。平板培地を用いて、*Acidovorax* に分類されるコロニーを獲得し単一種として大量培養することに成功した。

Acidovorax が *Nitrotoga* の活性化に関与しているかどうかを確認するために、*Nitrotoga* および *Acidovorax* を共培養した。96 ウェルプレートに亜硝酸 2.1 mM を含む無機培地と菌体を分注し、23°C で培養した。各ウェルから培地を定期的にサンプリングし、グリーンス試薬を用いた比色法によって亜硝酸濃度を測定した。培養 20 日後において *Nitrotoga* 単独培養系では、初期菌体数にかかわらず添加した亜硝酸の 85% 以上が消費されたウェルは 2% 以下だった。一方、*Nitrotoga* と *Acidovorax* を共培養させると、亜硝酸を消費したウェルの割合は初期菌体数が $10^4 \text{ cells mL}^{-1}$ だと 92%, $10^3 \text{ cells mL}^{-1}$ だと 20% だった。培養 46 日後では、単独培養系において *Nitrotoga* が亜硝酸を消費したウェルの割合は 60% ($10^4 \text{ cells mL}^{-1}$), 21% ($10^3 \text{ cells mL}^{-1}$), 3% ($10^2 \text{ cells mL}^{-1}$) となった。初期菌体数が $10^3 \text{ cells mL}^{-1}$ 以上の場合、*Nitrotoga* は *Acidovorax* と共存することで亜硝酸を消費する確率が高くなることがわかった。

次に *Acidovorax* と共存することで *Nitrotoga* が耐塩性を獲得するかどうかを確かめた。*Nitrotoga* 単独培養系と *Nitrotoga*-*Acidovorax* の共培養系について、塩を含まない無機培地と NaCl を 3.5% 含む人工海水培地でそれぞれ培養した。塩ストレスを与えていない無機培地条件における *Acidovorax* との共培養環境で、*Nitrotoga* の亜硝酸酸化活性は阻害された。*Nitrotoga* のような独立栄養細菌は、本来品栄養環境で生育しているために、有機物によって阻害を受けること

が報告されている。今回の共培養環境において、*Acidovorax* は *Nitrotoga* が分泌する代謝物を用いて、増殖をしていることが予想される。この際、*Acidovorax* が産生する有機物が *Nitrotoga* を阻害した可能性がある。一方、塩ストレスを与えた人工海水培地条件においては、*Nitrotoga* による亜硝酸消費が *Acidovorax* の有無に関わらず確認されなかった。*Nitrotoga* のゲノムには細胞内浸透圧を調節する機構は保存されておらず、単独では耐塩性を獲得できなかった。また、今回の培養条件において *Acidovorax* は *Nitrotoga* の耐塩性獲得に寄与しないことが示された。*Nitrotoga* と *Acidovorax* は培養期間中に凝集体を形成しなかった。予め凝集体を形成させておいたサンプルを用いれば、人工海水培地でも亜硝酸が消費されたかもしれない。長期間、人工海水培地に暴露させ、細胞を浸透圧に適応させることでも、耐塩性を獲得したかもしれない。人工海水を 60 日間流入させているバイオリアクターでは、*Nitrotoga* が優占し亜硝酸が消費されたことが報告されている。

Nitrotoga ではない異種の耐塩性微生物を獲得するため、製塩工場で用いられている海水、砂濾過システム、イオン交換膜をサンプリングした。菌叢解析するため、微生物の系統マーカーである 16S rRNA 遺伝子を対象に PCR 増幅した。砂濾過および海水サンプルからのみ、PCR 産物が電気泳動によって確認できた。砂濾過サンプルからは、従属栄養性の化学合成有機栄養生物や光従属栄養生物を含む *Rhodobacteraceae* や、光栄養生物や芳香族分解性の種を含む *Sphingomonadaceae* が多く検出された。また海洋堆積物で多く検出される *Woeseiaceae* の占有率も高かった。*Woeseiaceae* は近年メタゲノムが読まれ、 N_2O までの脱窒経路を持つことがわかっている。海水でも *Rhodobacteraceae* が多く、その他に好熱性細菌で水素や有機物を酸化して増殖する *Hydrogenophilaceae*、化学合成有機栄養生物でよく知られた海洋性細菌である *Alteromonadaceae* の割合が高かった。なお *Spongiibacteraceae* や *Nitrincolaceae* は占有率が高かったが文献が非常に少なく、生態については不明な点が多い。なお *Nitrotoga* は検出されなかった。亜硝酸を産生する硝化菌 *Nitrosomonadaceae* が砂濾過サンプルに 0.1% 存在していた。

電気泳動の結果、イオン交換膜には PCR の検出限界以下の微生物しか存在しないことが明らかになった。これより電気透析より前の工程において、微生物はほぼ完全に排除されていると考えられる。一方、その前段階の砂濾過工程においては、生物学的な水質浄化が起こっていると見込まれている。今回は、砂濾過装置を 24 時間稼働している都合から、直接的に砂サンプルを採取することはできなかった。しかし砂濾過装置の逆洗浄廃水が流れこんだ土砂からは、分離培養すると人工海水培地では生育できない硝化菌 *Nitrosomonadaceae* を採取することができた。このため高密度に微生物が存在し、さらに海水中の不純物除去が行われる砂濾過装置内において、より多くの硝化菌が存在する可能性が見込まれる。そこで翌年度は、砂濾過装置を停止するメンテナンス期間に再度サンプリングを行い、微生物の付着した砂濾過サンプルの獲得を試みる。さらに、人工海水培地を用いて、耐塩性微生物の分離培養を目指す。

1. 研究目的

我が国の製塩プロセスでは鹹水を得るためにイオン交換膜を利用している。イオン交換膜上に海水中の微生物群が付着すると、微生物共同体として知られているバイオフィームを形成し、電気抵抗の急激な上昇を引き起こす。バイオフィームは主に多種多様な微生物種によって産生される細胞外マトリクス成分で構成されている。バイオフィームは、環境ストレス(乾燥、栄養飢餓、抗菌薬、浸透圧など)から細胞を守る防御壁として機能するため、バイオフィーム内部は微生物の増殖に都合の良い環境条件となっている。例えば、バイオフィームを形成することで塩濃度を

上昇させた合成培地においても、微生物は耐塩性を獲得し活性を維持できることが報告されている⁽¹⁾。耐塩性微生物の温床となっているバイオフィーム形成を未然に防ぐことができれば、製塩プロセスにおけるコストやエネルギーのロスを低減できる。そこで申請者は、「海水に棲息する耐塩性微生物の増殖機構の特徴を理解できれば、バイオフィーム形成を防止でき、イオン交換膜の生物汚染を抑制する方法論を提案できる」と考えた。

海水中における個々の微生物の生存戦略を調べるためには、微生物を単一種として培養できる状態にある分離株を獲得し、様々な環境条件下での増殖活性を評価す

ることが必須である。本研究室では、海洋沿岸域に生息しているにも関わらず、分離培養すると海水と同じ塩濃度条件下で増殖活性を著しく低下させてしまう耐塩性微生物 *Nitrotoga* を獲得している⁽²⁾。この現象は、分離株では海水中で増殖できない微生物でも、異種微生物と共存することで耐塩性を獲得することができることを意味している (Figure 1)。

海水中の好塩性微生物が生存できる仕組みについては、従来から細胞膜を介した浸透圧との関係性が議論されてきた。通常、塩濃度が高くなると浸透圧が高くなるため、細胞内の水分は脱水されて細胞増殖ができず、死滅する。このような条件に耐えるためには、細胞内に浸透圧を高めて外部の浸透圧とバランスを保つ物質がなければならない。そこで、細胞内の個々のイオン濃度やアミノ酸濃度を調節することで、塩ストレスの大きい過酷な環境下でも生存できることが知られている⁽³⁾。一方、耐塩性微生物の中には、淡水環境を好むが、塩ストレス存在下でも異種微生物とバイオフィルム中で共存することで増殖できるものもいると申請者は考えている。申請者の知る限り、この

ように「海洋微生物が異種微生物との共存によって耐塩性を獲得する」という機構を提唱した例は国内外に見当たらない。そこで本研究では、耐塩性微生物を対象にゲノム情報を獲得し、異種微生物と共存させた場合の塩ストレスに対する適応機構を分子レベルで解明する。

2. 研究方法

2. 1. *Nitrotoga* が異種微生物と共存することで耐塩性を獲得する適応機構の解明

2. 1. 1. *Nitrotoga* の培養

分離培養した *Nitrotoga* は人工海水中で活性を示さなかったため、NaCl を含まない培地で培養した。培地組成は、25.4 mg L⁻¹ K₂HPO₄, 40.6 mg L⁻¹ MgSO₄·7H₂O, 6.6 mg L⁻¹ CaCl₂·2H₂O, 3.2 mg L⁻¹ FeSO₄·7H₂O, 54.2 g L⁻¹ MnSO₄·5H₂O, 49.4 g L⁻¹ H₃BO₃, 43.1 g L⁻¹ ZnSO₄·7H₂O, 27.6 g L⁻¹ Na₂MoO₄O₄, and 25 g L⁻¹ CuSO₄·5H₂O とした。エネルギー源および窒素源として NaNO₂ を培地に添加した。

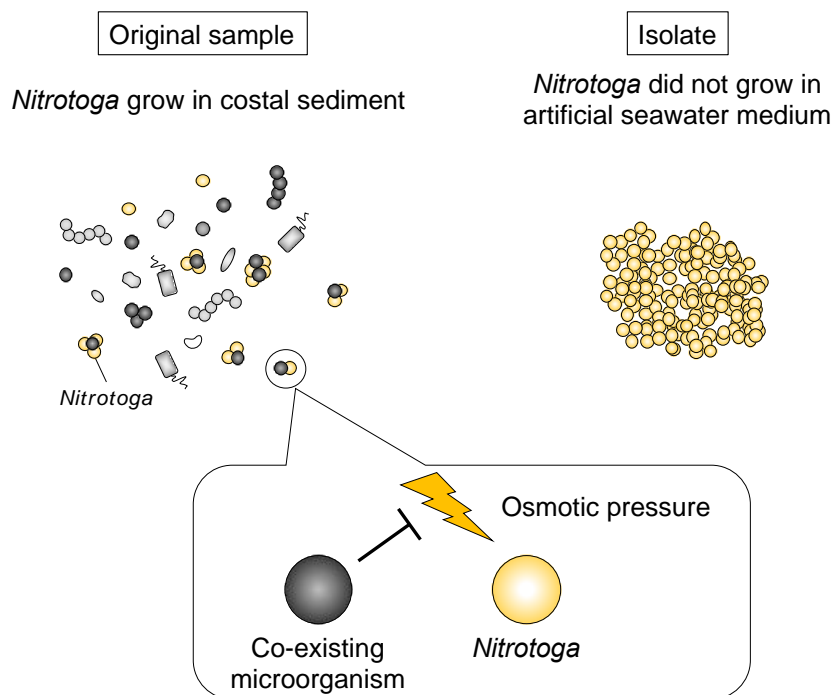


Figure 1 Non-marine *Nitrotoga* acquires salt tolerance by coexistence with other microorganisms.

2. 1. 2. *Nitrotoga* と共存する微生物の同定および分離培養

実験室環境で培養しているフラスコ内では、共存微生物は *Nitrotoga* に付着し凝集体を形成すると考えた。*Nitrotoga* と共存微生物が形成する凝集体を分取するため、サンプルをセルソーター (FACS AriaII; Becton Dickinson) へ供試した。大きさ表す前方散乱光と内部構造の複雑さを表す側方散乱光を指標としてサンプルを解析した。1 万個のシングルセルあるいは凝集体を解析した結果をドットプロットに表示した。*Nitrotoga*-共存微生物の凝集体が分取できるエリアを決定するため、ドットプロットを 10 のサブエリアに分割した。各サブエリアに含まれる細胞を 12 ウェルスライドガラスの 1 ウェルに 100 個播種し、顕微鏡観察した。最も *Nitrotoga*-共存微生物の凝集体が分取されたサブエリアを同定し、そのエリアに含まれる細胞を 96 ウェルプレートの各ウェルへ播種した。ソートされた凝集体を 96 ウェルプレートで 2 ヶ月間培養し、*Nitrotoga* が増殖したウェルを同定した。同定したウェルを継代培養し、スケールアップした。

寒天、アガロース、ゲランガムを用いて、Luria-Bertani (LB) 培地、Nutrient-Broth (NB) 培地、R2A 培地をゲル化させ、培養プレートを作成した。プレートにスケールアップ後培養サンプルを播種し数日間培養した。プレート上に生えたコロニーをピックし、16S rRNA 遺伝子配列をシーケンスした。

2. 1. 3. 顕微鏡観察

サンプルを 12 ウェルスライドガラスの 1 ウェルに滴下し風乾した。スライドガラスを 50%, 80%, 100% エタノールにそれぞれ 3 分間浸し、細胞を脱水した。蛍光標識した fluorescence *in situ* hybridization (FISH) プローブ、ドデシル硫酸ナトリウム、ホルムアミド、緩衝液の混合液をスライドガラスに滴下し、46°C で 2 - 4 時間放置した。混合液を洗い流して風乾した後に、退色防止剤 (SlowFade Gold; Invitrogen) を滴下した。蛍光顕微鏡 (Axioskop 2 plus; Carl Zeiss) で蛍光標識したサンプルを観察した。

2. 1. 4. 活性試験

96 ウェルプレート内で *Nitrotoga* および共存微生物を共培養した。96 ウェルプレートに亜硝酸 2.1 mM を含む無機培地と菌体を分注し、23°C で培養した。各ウェルから培地を定期的にサンプリングし、グリーンス試薬を用いた比色法

によって亜硝酸濃度を測定した⁽⁴⁾。添加した亜硝酸の 85% (1.8 mM) 以上を消費したウェルでは、「*Nitrotoga* が増殖した」と判断した。

また、無機培地もしくは人工海水培地を入れたフラスコ内でも *Nitrotoga* と共存微生物を共培養した。*Nitrotoga* が特定の微生物と共存することで耐塩性を獲得することを評価する活性の指標として、*Nitrotoga* による亜硝酸の酸化速度を測定した。無機培地もしくは人工海水培地へ、終濃度が 3 - 4 mM になるように亜硝酸を添加した。培養温度は 23°C とした。数日おきにサンプリングし、-20°C で保存した。*Nitrotoga* と共存微生物の混合比は 1:1 となるように調整した。

2. 2. 製塩システムに生息する海洋微生物の解析

2. 2. 1. サンプリング

2019 年 8 月 28 日に、ナйка塩業 (岡山県玉野市胸上) の本社工場において、採かん工程よりサンプルを採取した。採かん工程では、汲み上げた海水から膜濾過と砂濾過で不純物を除去し、イオン交換膜を用いた電気透析で塩を濃縮する。濾過後の処理水の濁度は、水道水の検査基準の 1/10 程度の非常に低い値になり、さらに電気透析で使用されるイオン交換膜はナノメートルスケールの微小な物質しか透過しないため、微生物は完全に除去される。なお濾過装置には不純物が蓄積するため、1 日に 1 回ほど海水を逆流させて洗浄する (逆洗浄)。逆洗浄の廃液の流出口付近の海水と土砂をサンプリングした。

さらに電気透析装置で使用されているイオン交換膜からサンプリングした。アニオン (陰イオン) 交換膜とカチオン (陽イオン) 交換膜は粗い網目のネットで仕切られており、ネットは機械洗浄され、交換膜はスポンジを使って手作業で洗浄される。交換膜の表面に付着した汚れをスポンジでそぎ落とし回収した。

サンプルは当日のうちに常温で持ち帰り、各サンプルを 50 mL × 2 本ずつ分注し、-80°C と -20°C で冷凍保存し、残りを 4°C に冷蔵保存した (Figure 2)。

2. 2. 2. 細菌叢解析

50 ml 遠沈管に分注した 3 種類のサンプルから、それぞれ別々の方法で DNA を抽出した。土砂に対しては、土壌用の抽出キット Fast DNA SPIN Kit for Soil (funakoshi) を使用した。海水は 50 mL を遠心すると (4,000 rpm, 10 分間)、小さな沈殿物が確認された。これを吸い込むように

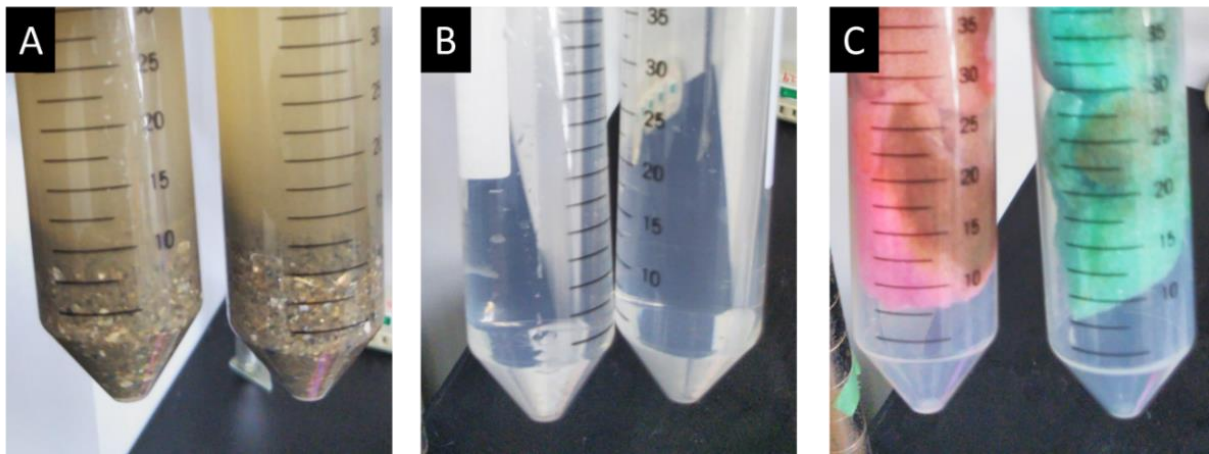


Figure 2 Samples for DNA extraction. (A) Sediment. (B) Seawater. (C) The dirt wiped from electro-dialysis membrane.

1,000 μL だけ回収した。アニオンおよびカチオン交換膜由来のサンプルは、スポンジに付着した汚れを Milli-Q water に懸濁し、1,000 μL だけ分注して回収した。これらの懸濁液を遠心分離して上清を捨て、ペレットをビーズ破碎し、ISOPLANT II (NIPPON GENE) で DNA 抽出した。16S rRNA 遺伝子の V7 - V8 領域を PCR 増幅し、Ion Personal Genome Machine Sequencer (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) を用いてシーケンシングした。生データを CLC genomics workbench v.5.5.1 (Qiagen, Hilden, Germany) 0に取り込み、クオリティーの低いリード (quality score < 0.05), キメラ配列 (maximum number of ambiguities < 2), 短いリード (< 300 bp) を取り除いた。解析には MacQIIME⁽⁵⁾ を利用した。16S rRNA 遺伝子配列の相同性が 97% 以上を同一の菌種 (operational taxonomic unit: OTU) としてクラスタリングした。データベースを参照し、各 OTU の代表配列の属種名を同定した。

3. 研究結果

3. 1. *Nitrotoga* が異種微生物と共存することで耐塩性を獲得する適応機構の解明

3. 1. 1. *Nitrotoga* と共存する微生物の分離培養

耐塩性 *Nitrotoga* が集積されたサンプルをセルソーターへ供試した。前方散乱光と側方散乱光のシグナルが大きいエリアから、主に *Nitrotoga* で構成されたいびつな形をした微生物凝集体を 96 ウェルプレートの各ウェルへ播種

した。96 ウェルプレートで 2 ヶ月間培養し、*Nitrotoga* が増殖したウェルを同定した。実験に必要なバイオマスを確保するため、1 ウェル (150 μL) から 25 mL チューブ、500 mL 瓶へとサンプルをスケールアップした。スケールアップ後培養サンプルを固体培地に播種したところ、複数のコロニーが形成された。16S rRNA 遺伝子配列に基づき、*Acidovorax* 属の細菌であると同定した。

3. 1. 3. *Acidovorax* 存在下における *Nitrotoga* の活性

培養 20 日後において *Nitrotoga* 単独培養系では、初期菌体数にかかわらず添加した亜硝酸の 85% 以上が消費されたウェルは 2% 以下だった (**Figure 3**)。一方、*Nitrotoga* と *Acidovorax* を共培養させると、亜硝酸を消費したウェルの割合は初期菌体数が 10^4 cells mL^{-1} だと 92%, 10^3 cells mL^{-1} だと 20% だった。培養 46 日後では、単独培養系において *Nitrotoga* が亜硝酸を消費したウェルの割合は 60% (10^4 cells mL^{-1}), 21% (10^3 cells mL^{-1}), 3% (10^2 cells mL^{-1}) となった。初期菌体数が 10^3 cells mL^{-1} 以上の場合、*Nitrotoga* は *Acidovorax* と共存することで亜硝酸を消費する確率が高くなることがわかった。

Nitrotoga 単独培養系と *Acidovorax* との共培養系のそれぞれについて、無機培地と人工海水培地で培養した (**Figure 4**)。無機培地条件では、単独培養系と比較して共培養系において亜硝酸消費が阻害された。また人工海水培地条件においては、単独培養系・共培養系ともに亜硝酸は消費されなかった。

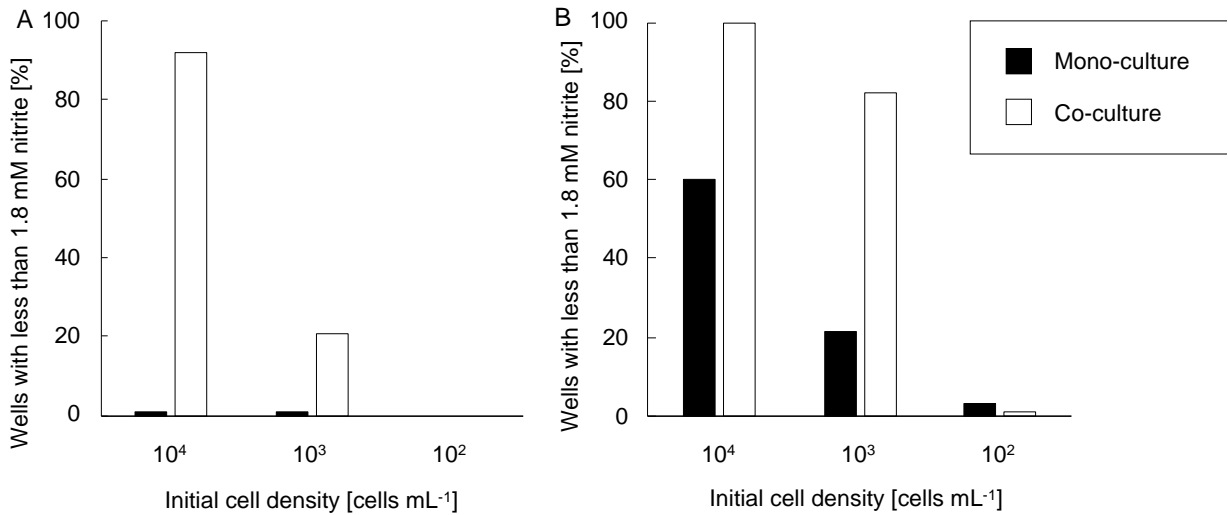


Figure 3 *Nitrotoga* (mono-culture) and *Nitrotoga-Acidovorax* (co-culture) were incubated in 96 wells microplates where mineral with 2.1 mM nitrite were added and temperature was maintained at 23°C. The nitrite concentrations were measured (A) 20 and (B) 46 days after incubation.

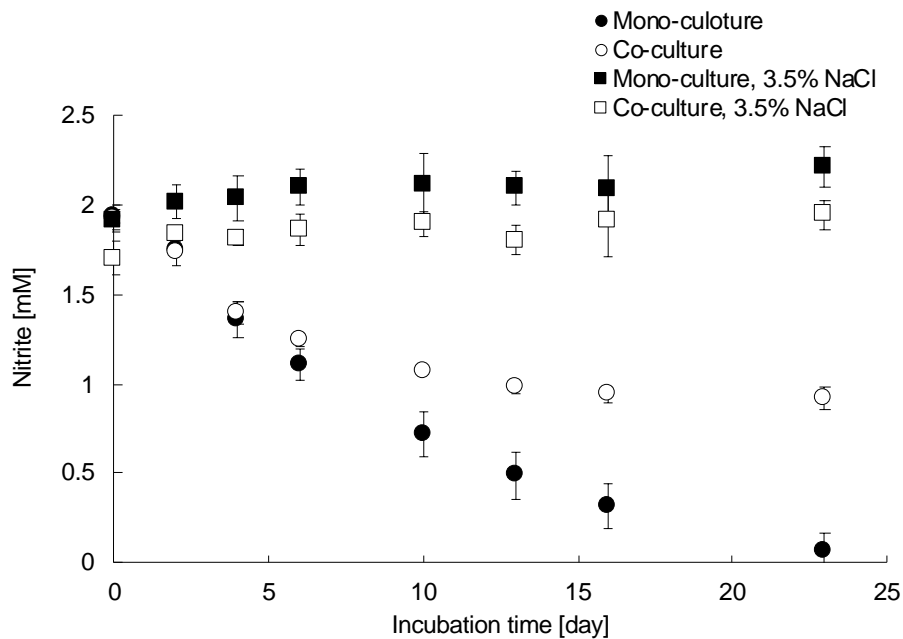


Figure 4 *Nitrotoga* (mono-culture) and *Nitrotoga-Acidovorax* (co-culture) were incubated in mineral and medium and artificial seawater amended by 3.5% NaCl. Error bars indicate standard deviation. The experiments were performed in biological triplicate

3. 2. 製塩システムに生息する海洋微生物の解析

細菌叢解析のため、全ての細菌が共通に持つ 16S rRNA 遺伝子を対象に PCR 増幅した。土砂由来のサンプルでは明瞭なバンドが現れ、海水由来のサンプルでもわずかにバンドが検出された (Figure 5)。一方、イオン交換

膜由来のサンプルでは PCR 増幅は起こらなかった。このため細菌叢解析は、土砂と海水のみを対象に行った。

増幅された PCR 産物を解析し、細菌叢を調べた (Figure 6)。土砂では、従属栄養性の化学合成有機栄養生物や光従属栄養生物を含む *Rhodobacteraceae* や、光栄養生物や芳香族分解性の種を含む *Sphingomonadaceae*

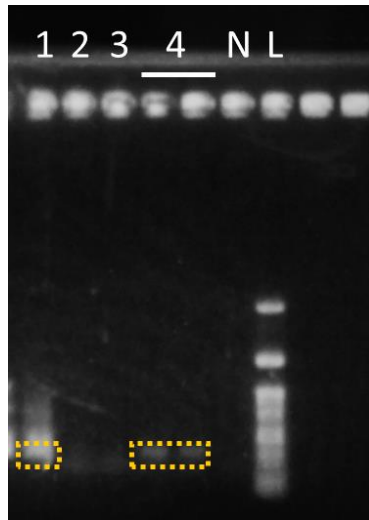


Figure 5 PCR band of 16S rRNA gene. 1: Sediment, 2: Anion-exchange membrane, 3: Cation-exchange membrane, 4: Seawater, N: Negative control, L: DNA ladder. An area of approximately 250 bp corresponding to the length of the PCR product is indicated by a yellow frame with reference to the DNA ladder.

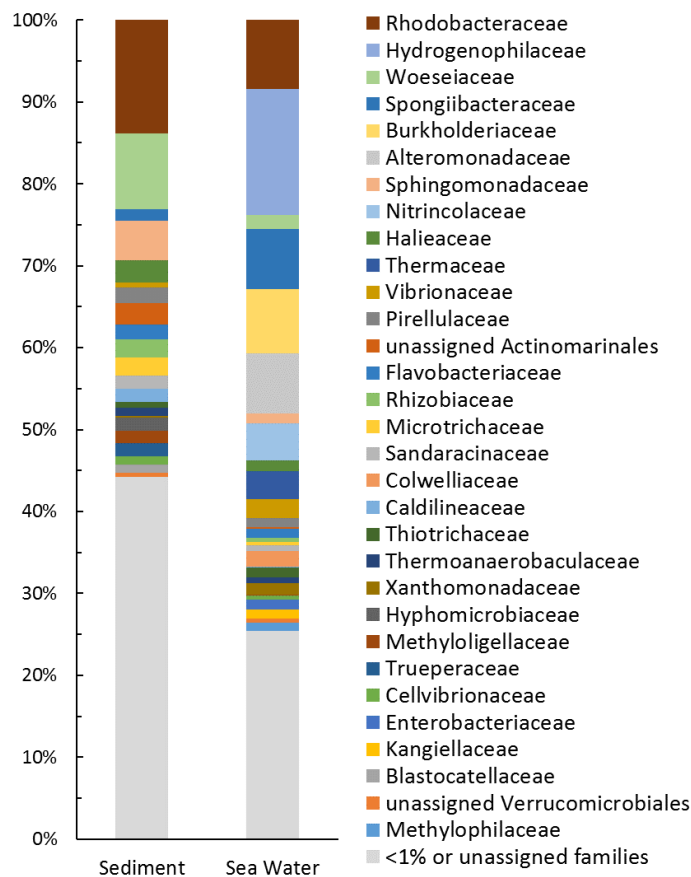


Figure 6 Bacterial community structure of the sediment and seawater samples based on 16S rRNA gene sequences. The community members are grouped at the family level. Groups assigned at the family level were described as “unassigned order names”.

などが多く検出された。また海洋堆積物で多く検出される *Woeseiaceae* の占有率も高かった。*Woeseiaceae* は近年メタゲノムが読まれ、 N_2O までの脱窒経路を持つことがわかっている⁽⁶⁾。

海水でも *Rhodobacteraceae* が多く、その他に好熱性細菌で水素や有機物を酸化して増殖する *Hydrogenophilaceae*、化学合成有機栄養生物でよく知られた海洋性細菌である *Alteromonadaceae* の割合が高かった。なお *Spongiibacteraceae* や *Nitrincolaceae* は占有率が高かったが文献による情報が非常に少なく、生態については不明な点が多い。なお硝化菌については海水では検出されず、土砂では *Nitrosococcales* が 0.3%、*Nitrosomonadaceae* が 0.1%とわずかなアンモニア酸化細菌が検出されるのみであった。

4. 考察

4.1. 共存微生物 *Acidovorax* が耐塩性微生物 *Nitrotoga* に与えた影響

Nitrotoga 単独培養系では、培養後 20 日目の時点において亜硝酸が消費されたウェルの割合は 2% 以下だった。微生物種によって、増殖に一定の細菌数が必要になることが報告されている⁽⁷⁾。プレートの培養日数を長くすると、一部のウェルでのみ *Nitrotoga* による亜硝酸消費が確認された。環境微生物やモデル微生物である大腸菌についても、細胞の再増殖は特定のタイミングで起こるわけではなく、細菌集団内でタイミングにばらつきがあることが報告されており⁽⁸⁾、今回の培養実験においても各ウェルにおいて確率的な増殖覚醒が起きたと考えられる。

Nitrotoga 単独培養系と比較すると、*Nitrotoga*-*Acidovorax* 共培養系では亜硝酸消費が生じたウェルの割合が上昇した。これは、*Acidovorax* が *Nitrotoga* の増殖を誘導したために、*Nitrotoga* が亜硝酸を酸化したこと由来していると予測できる。*Acidovorax* のような従属栄養細菌との共存による、増殖誘導は他の亜硝酸酸化細菌でも観察されている⁽⁹⁾。*Acidovorax* が *Nitrotoga* の増殖を誘導した理由の 1 つとして、*Acidovorax* が“増殖誘導因子”を産生したことが挙げられる。放線菌 *Micrococcus luteus* は増殖活発な状態において、休眠状態の *Micrococcus luteus* 自身の増殖覚醒を促すほか、*Mycobacterium* 属の増殖を

促進する効果をもつタンパク質を分泌することが知られている⁽¹⁰⁾。

無機培地において、*Acidovorax* による *Nitrotoga* の増殖誘導が確認できた一方、人工海水培地では *Nitrotoga* は *Acidovorax* と共存しても亜硝酸を消費しなかった。塩ストレスを与えていない無機培地条件における *Acidovorax* との共培養環境で、*Nitrotoga* の亜硝酸酸化活性は阻害された。*Nitrotoga* のような独立栄養細菌は、本来貧栄養環境で生育しているために、有機物によって阻害を受けることが報告されている⁽¹¹⁾。今回の共培養環境において、*Acidovorax* は *Nitrotoga* が分泌する代謝物を用いて、増殖をしていることが予想される^(12,13)。この際、*Acidovorax* が産生する有機物が *Nitrotoga* を阻害した可能性がある。

塩ストレスを与えた人工海水培地条件において、*Nitrotoga* による亜硝酸消費が確認されなかった。*Nitrotoga* のゲノムには細胞内浸透圧を調節する機構は保存されておらず、単独では耐塩性を獲得できなかった。また、今回の培養条件において *Acidovorax* は *Nitrotoga* の耐塩性獲得に寄与しないことが示された。*Nitrotoga* と *Acidovorax* は培養期間中に凝集体を形成しなかった。予め凝集体を形成させておいたサンプルを用いれば、人工海水培地でも亜硝酸が消費されたかもしれない。長期間、人工海水培地に暴露させ、細胞を浸透圧に適応させることでも、耐塩性を獲得したかもしれない。人工海水を 60 日間流入させているバイオリクターでは、*Nitrotoga* が優占し亜硝酸が消費されたことが報告されている⁽¹⁴⁾。

4.2 製塩システムに生息する海洋微生物の解析

PCR の結果、イオン交換膜の汚れには PCR の検出限界以下の微生物しか存在しないことが明らかになった。これより電気透析より前の工程において、微生物はほぼ完全に排除されていると考えられる。一方、その前段階にあたる砂濾過工程においては、生物学的な水質浄化が起こっていると見込まれている。今回は、砂濾過装置を 24 時間稼働している都合から、直接的に砂サンプルを採取することはできなかった。しかし砂濾過装置の逆洗浄廃水が流れこんだ土砂からは、硝化菌を採取することができた。このため高密度に微生物が存在し、さらに海水中の不純物除去が行われる砂濾過装置内において、より多くの硝化菌が存在する可能性が見込まれる。そこで翌年度には、砂濾過装置を停止するメンテナンス期間に再度サンプリ

ングを行い、微生物の付着した砂サンプルの獲得を試みる。

5. 今後の課題

Nitrotoga と *Acidovorax* が凝集体を形成していることから、*Acidovorax* が *Nitrotoga* の活性向上に寄与しているという仮説を立てた。しかしながら、人工海水中において両者を共培養した結果、*Nitrotoga* の亜硝酸酸化活性は確認できなかった。*Nitrotoga* は NaCl を含まない培地で培養を続けていたため、耐塩機構を獲得するまでに時間がかかると考えられる。そこで人工海水培地を利用し、製塩施設に棲息する海洋微生物の獲得を目指すことにした。本研究と同様にセルソーターを用いることで、現在培養しているサンプルから、相互作用を及ぼし合っている海洋微生物を分離培養できると期待している。分離培養ができ次第、培養実験およびゲノム解析により、塩ストレス存在下での活性評価、バイオフィーム形成の評価、バイオフィーム形成に関わる遺伝子の同定をする。バイオフィームが形成される要因が明らかになれば、製塩プロセスにおいてフィルターが目詰まりを引き起こす海洋微生物を制御する方法論を提案できる。

6. 文献

- (1) Zhang ZJ, Chen SH, Wang SM, Luo HY. Characterization of extracellular polymeric substances from biofilm in the process of starting-up a partial nitrification process under salt stress Appl Microbiol Biotech (2011) 89:1563-1571.
- (2) Ishii K, Fujitani H, Soh K, Nakagawa T, Takahashi R, Tsuneda S. Enrichment and physiological characterization of a cold-adapted nitrite-oxidizing *Nitrotoga* sp. from an eelgrass sediment. Appl Environ Microbiol (2017) 83: e00549-17.
- (3) Margesin R, Schinner F. Potential of halotolerant and halophilic microorganisms for biotechnology. Extremophiles (2001) 5:73-83.
- (4) Hewitt EJ, Nicholas DJD. 1964. Enzymes of inorganic nitrogen metabolism, p 167 - 172. In Linskens HF, Sanwal BD, Tracey MV (ed), Modern methods of plant analysis, vol 7. Springer, Heidelberg, Germany.
- (5) Caporaso JG, Kuczynski J, Stombaugh J, Bittinger K, Bushman FD, Costello EK, et al. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. Nat Methods (2010) 7:335-6
- (6) Musmann M, Pjevac P, Kruger K, Dykstra S. Genomic repertoire of the Woeseiaceae/JTB255, cosmopolitan and abundant core members of microbial communities in marine sediments. ISME J (2017) 11:1276-81.
- (7) Batchelor SE, Cooper M, Chhabra SR, Glover LA, Stewart GS, Williams P, et al. Cell density-regulated recovery of starved biofilm populations of ammonia-oxidizing bacteria. Appl Environ Microbiol (1997) 63:2281-6.
- (8) Buerger S, Spoering A, Gavrish E, Leslin C, Ling L, Epstein SS. Microbial scout hypothesis, stochastic exit from dormancy, and the nature of slow growers. Appl Environ Microbiol (2012) 78:3221-8
- (9) Nowka B, Off S, Daims H, Spieck E. Improved isolation strategies allowed the phenotypic differentiation of two *Nitrospira* strains from widespread phylogenetic lineages. FEMS Microbiol Ecol (2015) 91
- (10) Nikitushkin VD, Demina GR, Kaprelyants AS. Rpf proteins are the factors of reactivation of the dormant forms of Actinobacteria. Biochemistry (Mosc) (2016) 81:1719-34
- (11) Lehtovirta-Morley LE, Ge C, Ross J, Yao H, Nicol GW, Prosser JI. Characterisation of terrestrial acidophilic archaeal ammonia oxidisers and their inhibition and stimulation by organic compounds. FEMS Microbiol Ecol (2016) 89:542-52.
- (12) Kindaichi T, Ito T, Okabe S. Ecophysiological interaction between nitrifying bacteria and heterotrophic bacteria in autotrophic nitrifying biofilms as determined by microautoradiography-fluorescence in situ

- hybridization. *Appl Environ Microbiol* (2004) 70: 1641-1650.
- (13) Okabe S, Kindaichi T, Ito T, Fate of ¹⁴C-labeled microbial products derived from nitrifying bacteria in autotrophic nitrifying biofilms. *Appl Environ Microbiol* (2005) 71: 3987-3994.
- (14) Navada S, Vadstein O, Tveten AK, Verstege GC, Terjesen BF, Mota VC et al., Influence of rate of salinity increase on nitrifying biofilms. *J Clean Prod* (2019) 238: 117835.

Acquisition of Resistance to Osmotic Pressure by Co-existing with Marine Microbes

Satoshi Tsuneda¹, Hirotsugu Fujitani², Kento Ishii¹

¹ Department of Life Science and Medical Bioscience, Waseda University

² Biomedical Research Institute, Advanced Industrial Science and Technology

Summary

The objective of this study is to reveal the mechanisms by which a non-marine microorganism acquires salt tolerance through coexistence with microorganisms. A salt manufacturing process in Japan use an ion-exchange membrane to obtain brine. When microorganisms in seawater attach to the membrane, biofilm is formed leading to increase electrical resistance. For investigating the survival strategies of a non-marine microorganisms in seawater, a single species isolate is needed to evaluate its growth activity under various cultivation conditions. Previously, our research group enriched non-marine nitrite-oxidizing bacterium “*Nitrotoga*”. The sample source was a costal sediment, but the isolated *Nitrotoga* cells did not grow in artificial seawater medium (ASM). This indicates that coexistence with other microorganisms allow non-marine *Nitrotoga* to acquires salt tolerance for survival in the sea environment.

We expected that coexisting microorganisms were in close proximity to *Nitrotoga* cells. The enriched *Nitrotoga* culture was applied to a cell sorting system to collect coexisting microorganisms with *Nitrotoga*. The dot plot area with forward scatter (FSC) and side scatter (SSC), reflecting the target particle size and complexity, respectively. Microscopic observation of the sorted aggregates showed that *Acidovorax* was attached to the *Nitrotoga* cells. *Acidovorax* was isolated using solid medium. *Nitrotoga* and *Acidovorax* were cultured together in ASM, however, no nitrite oxidation by *Nitrotoga* was observed. *Nitrotoga* did not form aggregates with *Acidovorax* during the cultivation. *Nitrotoga* may consume nitrite after *Nitrotoga*–*Acidovorax* aggregates pre-culture in ASM as “adaptation period”. A previous study reported that *Nitrotoga* was predominant nitrite-oxidizing bacteria in a bioreactor supplied with ASM over 60 days.

Then we tried to obtain other salt tolerant microorganisms from a salt plant. Seawater, sand filters, and ion-exchange membranes were collected. DNA extracted seawater and sand filters was amplified by universal bacterial primers targeting the 16S rRNA genes. The PCR products were sequenced using an Ion PGM system, and the microbial community compositions were analyzed. *Nitrosomonadaceae*, known as a non-marine ammonia-oxidizing bacterium, was detected from sand filters. The amplicon sequencing suggests that non-marine bacteria can acquire salt tolerance and grow in sand filters. In future, we will isolate non-marine bacteria with salt tolerance and reveal the mechanisms how to acquire salt tolerance.