

製塩前処理用砂ろ過器の目詰まりを引き起こす海洋性独立栄養細菌の 分離培養と性状解析

常田 聡¹, 藤谷 拓嗣², 石井 拳人¹, 高橋 悠¹

¹早稲田大学先進理工学部生命医科学科, ²中央大学理工学部生命科学科

概要 日本の製塩プロセスで用いられる無薬注砂ろ過前処理システムは環境保全・ランニングコストの両面でメリットがある。ただし、ろ過砂には海水中の微生物や有機物などの懸濁物質が付着するため、定期的な逆洗によってろ過砂層の目詰まりを防ぐ必要がある。しかし、逆洗後によって除去される懸濁物質は一部にとどまり、微生物の動態を十分にはコントロールできていない。さらに、微生物の系統や性状の理解は十分ではない。そこで本研究では、ろ過砂層に生息する微生物の詳細な系統や性状に着目した。微生物は砂表面にバイオフィームを形成して付着する。海洋は有機炭素源に乏しい貧栄養環境であるため、無機物を同化する独立栄養細菌がバイオフィーム形成に寄与していると考えられる。しかしそれらの細菌の培養研究例は非常に少なく、生理学的性質もほとんど不明である。そこで申請者は「海洋環境に生息する独立栄養細菌を培養・性状解明により、バイオフィーム形成の防止や懸濁物質の除去活性の向上など、ろ過システムを効率化する方法論を提案できるのではないか」と考えた。

海洋に幅広く棲息する化学独立栄養細菌の代表として、亜硝酸酸化を担う *Nitrospira* 属細菌に着目した。海洋由来の *Nitrospira* については知見が乏しく、分離株を使ったゲノム解析の研究が昨年世界で初めて報告された。しかし培養研究は未だ少なく、さらに未培養系統の *Nitrospira* が海洋に存在することが示唆されている。そこで本研究では、海水の砂ろ過層に生息する *Nitrospira* 属細菌の分離培養と性状解明を目指した。まず、製塩プロセスの採かん工程における砂ろ過システムからろ過砂を採取し、海水を再現した無機培地を用いて、定期的に亜硝酸を与える半回分培養を行った。16S rRNA 遺伝子を対象とした amplicon sequencing によって砂ろ過層と培養サンプルに生息する細菌叢を解析したところ、播種源のろ過砂には系統学的に新規な *Nitrospira* が存在することが明らかになった。また、砂を直接培養器に持ち込んだ系では、この *Nitrospira* が増殖し、相対存在量が上昇したことが明らかになった。一方、砂を培養器には移さず、超音波分散によって砂表面の細菌群を剥離した系では、*Nitrospira* の相対存在量は低くなっていた。以上の結果より、砂ろ過システムに生息する細菌には砂から剥離されやすい細菌とされにくい細菌がおり、特に *Nitrospira* は接着能力が非常に高く、逆洗などの圧力によっても剥離されにくいと推測される。そのため逆洗を繰り返した砂ろ過システムにおいても *Nitrospira* が剥離されずに残留し、持続的なバイオフィーム形成に寄与していると考えられる。また今回の研究では、砂ろ過システムに生息する *Nitrospira* を半回分培養によって集積することに成功した。今後はこの半回分培養サンプルを使用して、分離株の獲得を目指す。

1. 研究目的

日本の製塩プロセスでは電気透析工程の前処理に、凝集剤を使わない無薬注前処理工程が長年運用されてきた。無薬注砂ろ過前処理システムは海洋生態系への影響

が少なく、薬品や設備の費用を低く抑えられるため、環境保全・ランニングコストの両面でメリットがある⁽¹⁾。また、そのパフォーマンスは非常に安定しており、近隣の海域で植物プランクトンのブルーム(爆発的な増殖)が起こった時

期においても、有効にろ過機能を果たすことが報告されている⁽¹⁾。ろ過砂には海水中の微生物や有機物などの懸濁物質が付着するため、定期的な逆洗によってろ過砂層の目詰まりを防ぐ必要がある。しかし逆洗によって除去される懸濁物質 (Suspended Solid) の量は 14%にとどまり、ろ過砂層の有機物は完全に除去されていないと考えられる⁽²⁾。一方でろ過砂層に付着した微生物は懸濁物質の除去において有益な効果を持つとも考えられているが、ろ過砂層に生息する微生物群の具体的な系統は明らかになっていない⁽¹⁾。さらに、砂ろ過装置の定期的な停止後には処理水中の濁質量 (Silt Density Index) が一時的に上昇するなど、微生物の機能や活性を十分にはコントロールできていない⁽¹⁾。以上のように、砂ろ過システムに微生物の関与が認められてはいるものの、その系統や性状の理解は十分ではない。そこで本研究では、ろ過砂層に生息する微生物の詳細な系統や性状に着目した。

逆洗後も微生物が残存する理由として、微生物の増殖に有利な粘着質のバイオフィームを形成することが挙げられる。海洋は有機炭素源に乏しい貧栄養環境であるため、ろ過砂層のバイオフィーム形成に関わっているのは主に無機物を同化可能な独立栄養細菌であると推測されるものの、それらの細菌の培養研究例は非常に少ない。ゆえに生理学的性質がほとんど不明であり、海洋独立栄養細菌の生理活性をコントロールするための対策を講じることができていない。そこで申請者は、「海洋環境に生息する独立栄養細菌の培養・性状解明により、バイオフィーム形成の防止や懸濁物質の除去活性の向上など、ろ過システムを効率化する方法論を提案できるのではないかと考えた。海洋に幅広く棲息する化学独立栄養細菌の代表として、硝化菌が知られている。硝化はアンモニア酸化 ($\text{NH}_3 \rightarrow \text{NO}_2^-$) と亜硝酸酸化 ($\text{NO}_2^- \rightarrow \text{NO}_3^-$) の 2 段階から成る反応であり、硝化菌はこれらの酸化反応から生存に必要なエネルギーを獲得する。硝化の最終生成物である硝酸 (NO_3^-) は植物プランクトンの窒素源として重要であり、また硝化の副反応で発生する亜酸化窒素 (N_2O) は地球温暖化を引き起こす温室効果ガスとして注目されている⁽³⁾。このように硝化反応は海洋の窒素循環において重要な役割を持ち、その生理学に向けた関心から培養研究が行われてきた。中でもアンモニア酸化反応を担う複数の分離株が獲得され、その系統間の性状の違いが議論されてきた

が⁽⁴⁾、2 段階目を担う亜硝酸酸化細菌 (NOB: nitrite-oxidizing bacteria) に焦点を当てた研究は少ない。特に硝化菌の一群である *Nitrospira* 属は、地球規模では最も高頻度で検出される NOB であるが、海洋における存在量は比較的少ないため、十分な研究が行われてこなかった。海洋由来の *Nitrospira* について、分離株を使ったゲノム解析や網羅的なタンパク質の発現解析が、昨年世界で初めて報告された⁽⁵⁾。しかし海洋由来の *Nitrospira* を培養した研究はまだ少なく、さらに未培養系統の *Nitrospira* が海洋に存在することが示唆されており⁽⁶⁾、その生態を知る手段となる培養サンプルは未だない。そこで本研究では、海水の砂ろ過層に生息する *Nitrospira* 属細菌の分離培養と性状解明を行い、砂ろ過システムの生物汚染抑制の方法論を提案することを目的とする。

2. 研究方法

2. 1. サンプリング

ナйкаイ塩業 (岡山県玉野市胸上) の本社工場において、採かん工程の砂ろ過システムよりサンプリングした。なお、ろ過装置は 1 日に 1 回の逆洗の他に、1 年に 2 回システムを停止して洗浄・砂の追加作業を行う。今回は砂ろ過システムを完全に停止した 2020 年 12 月 23 日に、砂ろ過装置より砂を採取した。採取した砂を冷蔵で早稲田大学 (東京都新宿区) に輸送後、培養用サンプル (4°C 冷蔵) と DNA 抽出用サンプル (-20°C 冷凍) に分け、それぞれ保管した。

2. 2. 半回分培養

分離培養に先立ち、サンプル中の *Nitrospira* 属細菌の存在量を高める (集積する) ため、培地成分を繰り返し添加する半回分培養をした。培養系として、2.1 で分注した培養用ろ過砂を培地に浸した系「sand (+) culture」と、ろ過砂を培地中で超音波分散して得た懸濁液のみの系「sand (-) culture」を用意した (Figure 1, Figure 2)。培地は、一般的な NOB の培養に用いられる Mo, Co, Cu, Zn を含む無機培地を採用した。さらに海水の塩濃度を再現するため、重量あたり 3.5% の塩 (NaCl, MgCl₂, MgSO₄, CaCl₂) を混合した。①ろ過砂の有無と②添加する亜硝酸濃度で条件を振り、合計 4 系列を培養した (Figure 1)。終濃度が 0.1 mg/L (7 μM NO₂ 相当) または 10 mg/L (714 μM NO₂ 相当) になるように亜硝酸を添加した。週 3 回程度 Griess test によって亜硝酸の消費を確認し、亜硝酸が完全に消

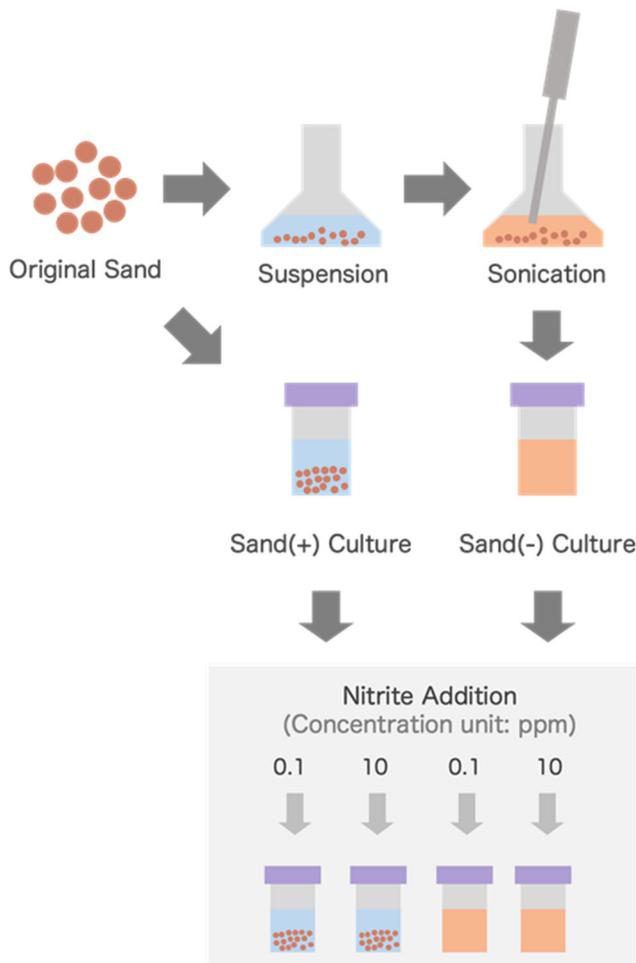


Figure 1. The scheme of fed-batch cultivation. The sand (+) cultures contained original soil and mineral medium, while sand (-) cultures contained the supernatant of sonicated sand samples. Both cultures were supplied with nitrite. The final concentrations of nitrite in the cultures were set at 0.1 or 10 mg/L.

費されている場合は再び 0.1 mg/L ないし 10 mg/L になるように亜硝酸を再添加した。全ての系列は 23°C で静置培養し、亜硝酸添加やサンプリング等の作業を行うとき以外は暗所で保管した。

2. 3. DNA 抽出

ろ過砂および培養サンプルから、16S amplicon sequencing のために DNA を抽出した。ろ過砂および sand (+) culture は、砂を 500 μ L 採取した。Sand(-) culture から培養液を 500 μ L 採取した。各サンプルより FastDNA SPIN Kit for Soil (MP-Biomedicals) を用いて DNA を抽出し、-20°C で冷凍保存した。

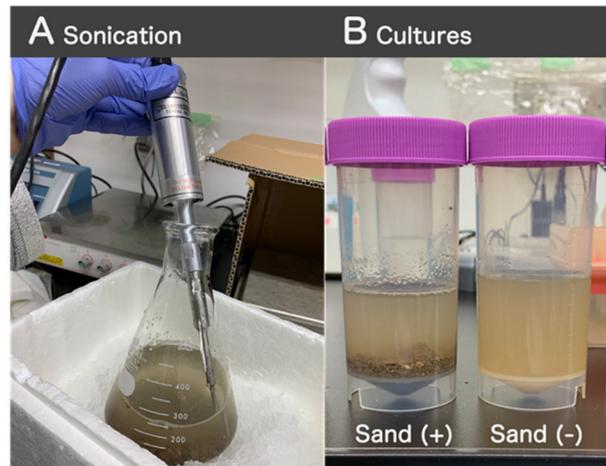


Figure 2. (A) Sonication of original sand in a mineral media. (B) Cultures with sand and without sand.

2. 4. 16S amplicon sequencing

抽出 DNA の全細菌ゲノムに含まれる 16S rRNA 遺伝子を対象に、amplicon sequencing (PCR 産物の配列解析) によって細菌叢解析を行った。バーコード配列を付加したユニバーサルプライマー 1055f/1392r で V7-V8 領域の配列を PCR 増幅した。増幅産物の塩基配列を次世代シーケンサー Ion PGM を用いて決定した。シーケンスデータを細菌叢解析ソフト DADA2 で解析した。クオリティの低いリードおよび配列長が短いリードを除去し、1 菌株に相当する ASV (amplicon sequence variant) の配列と相対存在量の情報を取得した。Silva の最新版データセットに照合して ASV の系統を同定した。

2. 5. 系統解析

本研究で培養された *Nitrospira* の系統を把握するため、16S rRNA 遺伝子に基づく系統樹を作成した。ASV の配列に相同性の高いシーケンスデータを NCBI nucleotide database より収集した。解析ソフト MEGA X によって全配列を align したのち、Maximum-likelihood 法で Bootstrap iteration を 100 回に設定して系統樹を描画した。

3. 研究結果

3. 1. 半回分培養による *Nitrospira* の集積

培養期間中、週 3 回程の頻度で亜硝酸の消費を Griess test で確認した。ろ過砂を含む sand (+) cultures については、0.1 mg/L と 10 mg/L のどちらの系についても 1 週間以内に亜硝酸を完全に消費した。そのため両系共に週 2-3

回の頻度で亜硝酸を添加し続けた。一方、ろ過砂を含まない sand(-) cultures は亜硝酸消費速度が遅かった。亜硝酸 0.1 mg/L を添加した sand(-) culture は培養 19 日目まで亜硝酸が消費されなかった。亜硝酸 10 mg/L を添加した sand(-) culture はさらに消費が遅く、培養 26 日目まで亜硝酸が枯渇しなかった。

3. 2. 16S amplicon sequencing に基づく細菌叢解析

ろ過砂および半回分培養サンプルの細菌叢を 16S amplicon sequencing によって解析した。ただしバイオマスが少なく十分量の DNA が抽出できなかったサンプルについては、実験手技の限界により解析ができなかった。特に培養後の sand(-) culture は解析が困難であった。

細菌叢を科レベルの分類で解析した (Figure 3)。播種源のろ過砂 (original sand) において、NOB の *Nitrospira* 属が分類される *Nitrospiraceae* 科は 13% と高い存在量を占めていた。その他の主要な細菌として、*Colwelliaceae* 科と *Entotheonellaceae* 科がそれぞれ 37%, 14% を占めた。半回分培養を開始した day 0 の細菌叢を比較すると、ろ過砂を含まない sand(-) では *Colwelliaceae* 科が多く (34-37%), *Nitrospiraceae* 科が少なくなっていた (1%)。一方で sand(+) では *Nitrospiraceae* 科が比較的多く (9%), *Colwelliaceae* 科の存在量は元のろ過砂よりも少なくなっていた (20%)。培養開始時点の day 0 において系列間に細菌叢の違いが見られたことから、培養前の処理が細菌叢に影響を与えたと結論づけられる。

Sand(-) の系列では十分な亜硝酸消費活性がなく、コミュニティ解析に用いるだけの DNA が得られなかった。そこで培養後は Sand(+) cultures の day 7, day 14 のみ細菌叢解析を行った。亜硝酸濃度 0.1 ppm, 10 ppm のどちらでも *Nitrospiraceae* 科と *Desulfuromonadaceae* 科が増加した (Figure 3)。元のろ過砂における *Nitrospiraceae* 科の相対存在量 13% に対して、培養後は 23-55% まで集積された。このことから、本研究で採用した培養条件は、*Nitrospiraceae* 科の増殖に適しており、集積を促したと判断できる。

次に集積された *Nitrospiraceae* 科の多様性を評価するため、この科に含まれる ASV の構成を解析した (Figure 4)。*Nitrospiraceae* 科に分類される ASV が 12 個検出されたことから、培養サンプル中には複数の株に相当する *Nitrospiraceae* が存在することが明らかになった。ただしそ

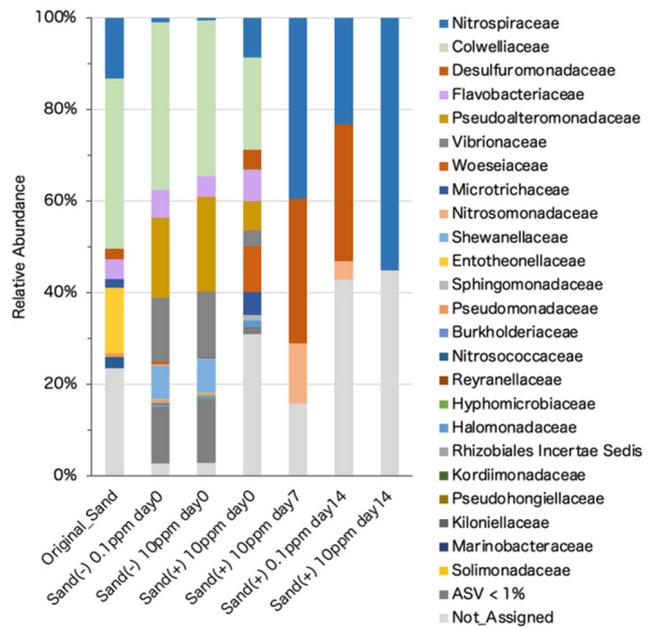


Figure 3. Bacterial community structures of original sand and fed-batch cultures based on 16S rRNA gene amplicon sequencing. The phylogenetic groups were analyzed at family levels. The minor ASVs with relative abundances of less than 1% were clustered into “ASV < 1%”. The taxon classified into unknown families were clustered into “Not Assigned”.

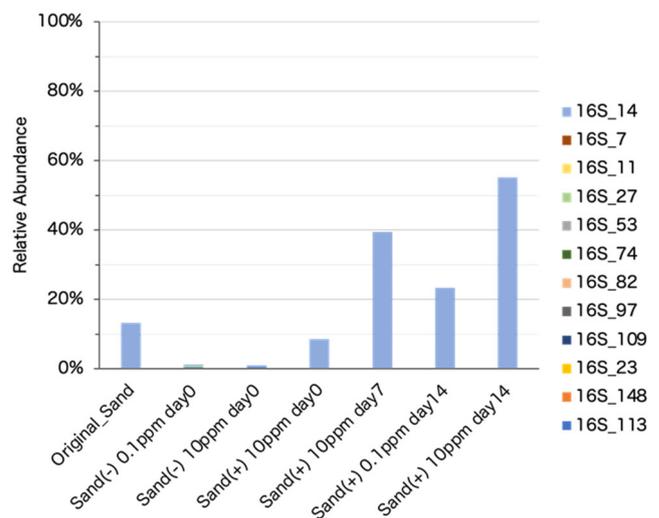


Figure 4. The community structures of family *Nitrospiraceae* based on 16S rRNA gene amplicon sequencing, analyzed at ASV level. The relative abundances indicate the proportions of ASVs in the whole bacterial communities.

のほとんどは一つの ASV(16S_14)であったため、今回解析したサンプルに含まれる *Nitrospiraceae* 科の多様性は低いと結論づけられる。また播種源のろ過砂 (original sand) において 16S_14 が優占していたが、同様の ASV が培養後のサンプル内においても集積された。ゆえに播種源に最も多く生存する *Nitrospira* を培養し、存在量を高めることができたと結論づけられる。

3. 3. *Nitrospira* の系統解析

本研究で集積された *Nitrospira* の新規性を評価するため、16S rRNA 遺伝子配列に基づく系統を解析した。

Nitrospira 属は系統学的な多様性が幅広く、複数の lineage に大別される。今回集積された ASV(16S_14)は lineage IV に分類された (Figure 5)。この lineage は特に海洋環境に適応した系統であることが知られており、*Nitrospira marina* や *Nitrospira* sp. Ecomares, *Nitrospira salsa* など複数の種が海洋から分離培養されている。ただし本研究で集積された 16S_14 はいずれの分離株とも同一性が低く、lineage IV の中でも比較的新規性の高い細菌であることが明らかになった (Figure 5)。

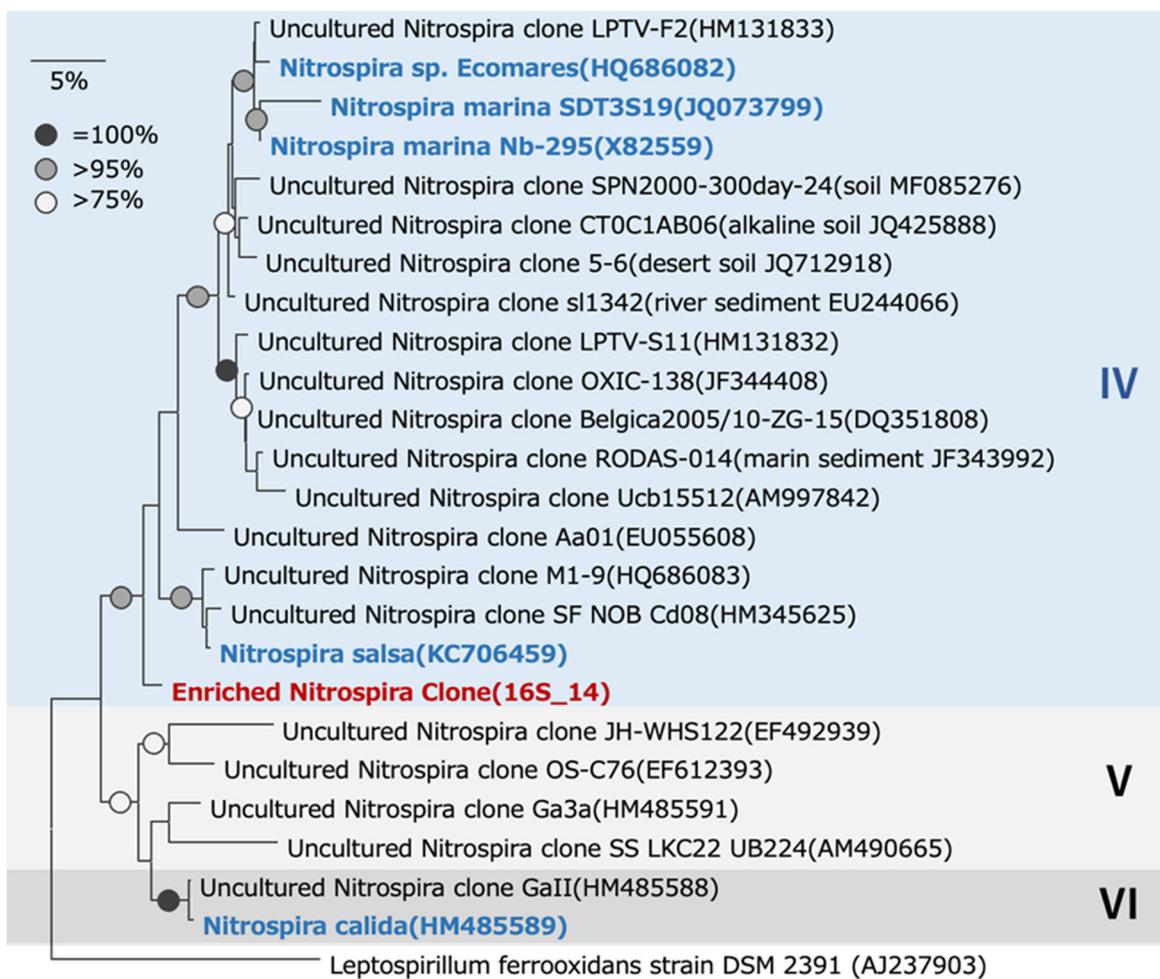


Figure 5. Phylogenetic tree of *Nitrospira* based on 16S rRNA gene nucleotide sequences. The sequences of isolated strains are shown as blue and bold letters. The sequence of the environmental clone obtained in this study is shown as red and bold letters. The different phylogenetic lineages (IV, V, and VI) are shown as different shades (blue, light gray, and dark gray). The sequence of *Leptospirillum ferrooxidans* was used as an outgroup.

4. 考 察

4. 1. 砂ろ過システムに生息する *Nitrospira* の分布

2019 年度の報告では今年度と同じナイカイ塩業でサンプリングを行ったが、システムが稼働中であったため、砂ろ過層から直接サンプルを採取することができなかった。代わりにろ過システムから逆洗で排出された廃液を採取し、16S amplicon sequencing を行ったが *Nitrospira* を検出することはできなかった。さらに今年度の研究では、超音波処理によってろ過砂に付着した菌体を剥離させた sand(-) culture では、播種元の original soil よりも *Nitrospira* の存在量が減少することが確認された (Figure 3)。一方で *Colwelliaceae* 科などの細菌は超音波分散後の上清で高い存在量を占めた。以上の結果より、砂ろ過システムに生息する細菌には砂から剥離されやすい細菌とされにくい細菌があり、特に *Nitrospira* は接着能力が非常に高く、逆洗などの圧力によっても剥離されにくいと推測される。さらに独立栄養細菌である *Nitrospira* は栄養基質の少ない無機環境においても増殖が可能であるため、バイオフィーム形成の初期において重要な細菌群であることが知られている。そのため逆洗を繰り返した砂ろ過システムにおいても *Nitrospira* が剥離されずに残留し、持続的なバイオフィーム形成に寄与していると考えられる。

4. 2. 分離培養に向けた展望

今回の研究では、砂ろ過システムに生息する *Nitrospira* を半回分培養によって集積することに成功した。さらに系統的解析により、集積された *Nitrospira* が高い新規性を持つことが示された。今後はこの半回分培養サンプルを使用して、分離株の獲得を目指す。ただし今回集積された *Nitrospira* は非常にろ過砂への接着能力が高く、超音波分散では十分に剥離できないことも示された。砂や多種細菌から *Nitrospira* を剥離し、分離株を獲得するためには、剥離技術と砂表面のバイオフィームを模した培養環境の確立が必要である。具体的には、酵素や薬品などを用いて、集積した *Nitrospira* を効率よく分離する手法を開発する。さらに分離後の増殖を促進するため、*Nitrospira* にとって最適な低酸素濃度・低基質濃度のバイオフィーム環境に近い培養条件を検討する。

5. 文 献

- 1) 竹内 和久, 田畑 雅之, 伊藤 嘉晃, 無薬注による海水前処理, 日本海水学会誌, 2013, 67 巻, 5 号, p. 279-282, 公開日 2014/09/17, Online ISSN 2185-9213, Print ISSN 0369-4550, <https://doi.org/10.11457/swsj.67.279>, https://www.jstage.jst.go.jp/article/swsj/67/5/67_279/_article/-char/ja
- 2) 合田 康秀, 製塩工場における海水前処理の現状, 日本海水学会誌, 2009, 63 巻, 6 号, p. 364-366, 公開日 2011/06/28, Online ISSN 2185-9213, Print ISSN 0369-4550, <https://doi.org/10.11457/swsj.63.364>, https://www.jstage.jst.go.jp/article/swsj/63/6/63_6_364/_article/-char/ja
- 3) Shafiee, R.T., Snow, J.T., Zhang, Q. et al. Iron requirements and uptake strategies of the globally abundant marine ammonia-oxidising archaeon, *Nitrosopumilus maritimus* SCM1. ISME J 13, 2295–2305 (2019). <https://doi.org/10.1038/s41396-019-0434-8>
- 4) Shafiee, R.T., Diver, P.J., Snow, J.T. et al. Marine ammonia-oxidising archaea and bacteria occupy distinct iron and copper niches. ISME COMMUN. 1, 1 (2021). <https://doi.org/10.1038/s43705-021-00001-7>
- 5) Bayer, B., Saito, M.A., McIlvin, M.R. et al. Metabolic versatility of the nitrite-oxidizing bacterium *Nitrospira marina* and its proteomic response to oxygen-limited conditions. ISME J 15, 1025–1039 (2021). <https://doi.org/10.1038/s41396-020-00828-3>
- 6) Daebeler, A., Kitzinger, K., Koch, H. et al. Exploring the upper pH limits of nitrite oxidation: diversity, ecophysiology, and adaptive traits of haloalkalitolerant *Nitrospira*. ISME J 14, 2967–2979 (2020). <https://doi.org/10.1038/s41396-020-0724-1>

Isolation and Characterization of Marine Chemolithoautotrophic Bacteria from a Sand Filter for Pretreatment of a Salt Production Process

Satoshi Tsuneda¹, Hirotsugu Fujitani², Kento Ishii¹, Yu Takahashi¹

¹ Department of Life Science and Medical Bioscience, Waseda University

² Department of Biological Sciences, Faculty of Science and Engineering, Chuo University

Summary

The sand filtration systems have been used in salt manufacturing processes for decades in Japan. Those systems are treated by back-washing to prevent contaminants adhering to the sand filters. However, back-washing cannot remove most of the microorganisms attaching to the sands. Furthermore, the phylogenies and properties of microorganisms have not been sufficiently studied. Here, we focused on the detailed characteristics of microorganisms inhabiting sand filtration systems. Since the ocean is an oligotrophic environment with low concentration of organic carbon source, autotrophic bacteria are thought to contribute to biofilm formation on the sand filters. However, their physiological properties are almost unknown because of the difficulty of cultivation. Therefore, we aimed to cultivate autotrophic bacteria inhabiting sand filtration system in a salt manufacturing process and propose a methodology to improve the performance of the sand filtration system.

As a representative of autotrophic bacteria, we focused on the genus *Nitrospira*. Although this genus oxidizes nitrite and play an important role in biofilm formation, little is known about this group derived from oceans. Therefore, we tried to isolate and cultivate *Nitrospira* inhabiting sand filters. First, the original sand was collected from the sand filtration system of Naikai Salt Industries. The biomass was cultivated in an inorganic medium in a fed-batch system with a supply of nitrite. The bacterial community analysis based on 16S amplicon sequencing revealed the presence of phylogenetically novel *Nitrospira* in the filter. Furthermore, *Nitrospira* was found to increase when the original sand was transferred directly into the fed-batch cultures. On the other hand, the supernatants of sonicated sands hardly contained *Nitrospira*. This result supports the high adhesive ability of *Nitrospira*. Thus, this genus might tolerate the pressure of backwashing and remain in the sand filtration system. In this study, *Nitrospira* from the sand filtration system was successfully cultivated, and further study to obtain their isolated strains is needed to reveal the detailed properties.