

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 21 日現在

機関番号：82111

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K18815

研究課題名(和文) 土壌中でのアンモニア酸化細菌の共存機構の解明

研究課題名(英文) Coexistence of ammonia-oxidizing bacteria in soil

研究代表者

大久保 卓 (Okubo, Takashi)

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・農業環境変動研究センター 物質循環研究領域・JSPS特別
研究員(PD)

研究者番号：70749275

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：土壌中で複数種のアンモニア酸化細菌が共存する仕組みを解明するために、固体表面と液体培地で2株のアンモニア酸化細菌の競合培養試験を行った。固体表面と液体培地では、異なる株が競争優位となることが明らかになった。この結果は、土壌粒子表面と土壌溶液では異なるアンモニア酸化細菌が棲息することを示唆しており、その棲み分けが自然環境中で多種共存を可能とする要因のひとつであると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Mathematical model predicts that two species competing for the same limiting resource can not coexist. To understand the coexistence mechanism of multiple species of ammonia-oxidizing bacteria in soil, the two closely related ammonia-oxidizing bacteria were cocultured in liquid and solid media. The different strains become dominant in liquid and solid media. These results suggest that the presence of soil particle and solution facilitate the coexistence of multiple species of ammonia-oxidizing bacteria in soil.

研究分野：微生物生態学

キーワード：アンモニア酸化細菌 多種共存

1. 研究開始当初の背景

アンモニア酸化細菌は、アンモニアを亜硝酸へ酸化する反応を利用してエネルギーを得る細菌である。生成された亜硝酸は、他の微生物の働きにより、硝酸や温室効果ガスである一酸化二窒素に変換され、地下水汚染や地球温暖化の原因となる。

アンモニア酸化細菌には、多様な種が存在する。種により増殖速度などの生理的な性質が異なるが、エネルギー源がアンモニアであるという点は共通している。このような同一の生活資源を求める種が、同一空間に存在すると資源の競合が起こり、安定的に両者が共存することはできないということが数理モデルにより予測されている。アンモニア酸化細菌はエネルギー源であるアンモニアを奪い合うため、非常に強い種間競争が起こり、多種共存は困難であると予想される。しかし、実際には土壌中には多様なアンモニア酸化細菌が共存していることが、土壌 DNA の配列解析により示されている。アンモニア酸化細菌の種や数は、土壌 pH、全窒素、全炭素、土壌の種類などの土壌理化学性により変化することが示されており、競争排除には至らないものの、環境に適したアンモニア酸化細菌種が選抜されると考えられるが(Tago et al. 2015)、実際の環境中で競争排除が起こらない原因は現在のところ明らかでない。

2. 研究の目的

土壌中でアンモニア酸化細菌の多種共存を可能にする仕組みを明らかにすることを目的とする。「同一の生活資源を求める種は、同一の空間中に共存できない」という数理モデルによる予測と現実に乖離が見られた原因として、「同一の空間」と「同一の資源」という言葉の捉え方に誤りがあった可能性を考え、土壌でアンモニア酸化細菌の多種共存を可能にする要因として以下の2つの仮説を設定した。

(1)生活空間による棲み分け

一見すると土壌は、均一な物質のように感じられるが、顕微鏡で観察すると、土壌には粒子と粒子間あるいは粒子内に空隙が存在することがわかる。土壌粒子表面と空隙は、細菌の生活環境としては大きく異なると考えられる。このような土壌の不均一性により、競争排除回避されている可能性が考えられる。既往研究でも、固体表面と液体では、同じ株でもアンモニア酸化活性が異なることが報告されている。

(2)生活資源による棲み分け

一部のアンモニア酸化細菌は、尿素をアンモニアに分解し、生成されたアンモニアを利用することができる。尿素などのアンモニア以外の化合物を利用することで、資源の競合度合いが軽減され、多種共存の成立に寄与すると考えられる。しかし、この場合でも間接

的にアンモニアの競合が起こることは避けられない。

本研究では、土壌の性質と深い関わりを持つ仮説(1)に着目し、分離菌株の培養試験により検証を行った。

3. 研究の方法

(1)供試菌株

土壌から分離された2株の *Nitrosospira* 属のアンモニア酸化細菌を実験に用いた。両者は、細菌の種分類に用いられる 16S rRNA 遺伝子の類似度が 99%以上である。液体培地での両者の増殖速度は異なり、一方は倍加時間が約 2.4 時間 (A 株)、他方は約 9.6 時間 (B 株) である。

(2)培養実験

2株の細菌を液体、個体表面上で連続的に単独培養、及び共培養した。液体培養は、微生物用ファーメンター (EYELA, M-1000A) を用いた。固体表面培養は、カラムにガラスビーズを充填し、培養液を連続的に供給することで行った。アンモニア源として 5mM の硫酸アンモニウムを含む培地を使用した。液体、個体培養ともに、供給培地の pH は 7.5 とした。希釈率は、液体培養では 0.1 (/day)、個体培養では 2 (/day) とした。固体表面条件では、液体中の浮遊細菌がウオッシュアウトされるように、希釈率を浮遊細菌の増殖速度よりも大きい値に設定した。液体培養条件では、増殖速度が遅い株でもウオッシュアウトされない条件に設定した。液体培養では、培養槽内の pH を 7.5 前後に維持されるように NaOH を添加した。個体培養では、培養期間中に大きな pH 変化が認められなかった。液体培養での培養開始時の菌株接種は、培養槽へ菌を直接接種することで行った。個体培養では、菌を含む培地を培養槽へ供給することで行った。接種後、供給液を無菌培地に変更した。この条件で、約 40 日間培養した。培養槽から排出される培地の亜硝酸濃度 (アンモニアの消費量) を継続的に計測した。共培養では、各菌株の存在比率の推移を 16S rRNA 遺伝子のアンプリコン解析により継続的に計測した。

4. 研究成果

(1)液体培養

種間相互作用を考慮しないロトカボルテラモデルでは、単独での培養時に増殖速度が小さい B 株が競争排除されることが予測される。この数理モデルによる予測の妥当性を検証するために、2株のアンモニア細菌を液体培地で共培養し、各菌株の存在比率の推移を継続的に計測した。図1のように増殖速度が小さい B 株は、培養日数が進むにつれて、存在比率の低下が見られ、培養 2.2 日ではほぼ競争排除された (0.01%以下)。培養 3.5 日でもわずかながら検出され、今回の培養期間中で

は完全な競争排除は起こらなかったが、一貫してB株の存在比率が低下し続けたことから培養期間を延ばすことで競争排除に至る可能性が高く、数理モデルによる予測を支持する結果となった。

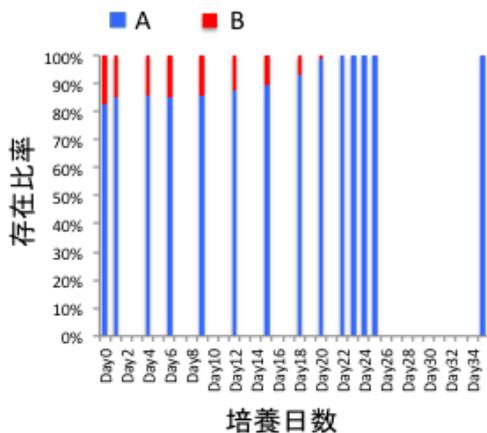


図1 液体培地で連続共培養したときの各菌株の存在比率の推移。培養0日時点でのB株の存在比率が小さいが、培地への接種菌数が等しくなかったことが原因である。コンタミネーションにより接種菌以外の菌が検出されたが、本図では除いて表示した。

(2) 個体培養

アンモニア消費量

固体表面での連続培養時にカラムから排出される培地の亜硝酸濃度を継時的に測定した。亜硝酸はアンモニアの酸化により生成されるので、濃度の増加速度は培養槽内のアンモニア酸化菌の菌数増加の指標となる。単独培養では、A株がB株よりも高い亜硝酸濃度の増加速度を示し(図2)、個体表面でも液体培地同様に、A株の増殖属性が大きいことが推定された。A株、B株の共培養では、培養30日以降の亜硝酸濃度がA株単独培養の半分以下の値となった。共培養が、単独培養の単純な足し合わせとはならなかったことから、共培養時に菌株間に何らかの相互作用が働くことが示唆された。

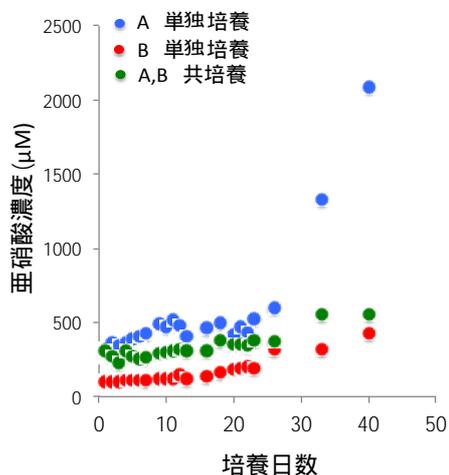


図2 培養槽からの排出液の亜硝酸濃度。

存在比率

A株、B株を個体表面で共培養し、固体表面と培養槽からの排出液の存在比率の推移を調べた。固体表面では、培養5日目までは、A株の存在比率が増加する傾向が見られたが、その後はA株の存在比率が低下する傾向が見られた(図3)。培養槽からの排出液でも培養5日目までは、A株の比率が増加したが、その後はA株の比率が低下した(図4)。固体表面、排出液ともに培養5日以前と以後で、逆の挙動を示した。その原因として培養初期には、最初に接種した菌が培養槽内の液体部分に浮遊菌として残存しており、液体培地条件での競争の効果が強く結果に反映され、培養日数が経つにつれて、浮遊菌がウォッシュアウトされ、固体表面での競争の効果が強く結果に反映されるようになった可能性が考えられる。培養5日目以降は、固体表面、培養槽からの排出液ともにB株の存在比率が上昇する傾向が見られたことから、固体表面では、B株が競争優位であると考えられる。

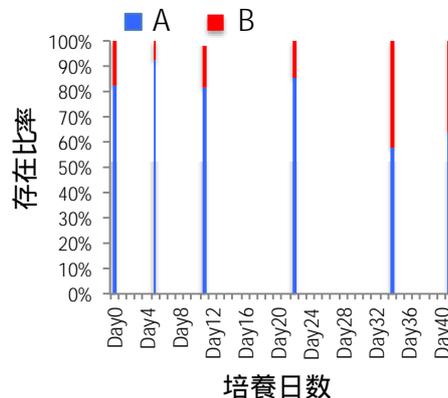


図3 固体表面での接種菌株の存在比率の推移。培養0日時点でのB株の存在比率が小さいが、その原因として接種菌数が等しくなかった可能性、及び菌株間の表面への付着の違いなどが考えられる。コンタミネーションにより接種菌以外の菌が検出されたが、本図では除いて表示した。

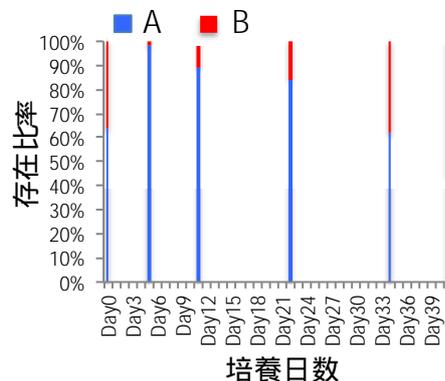


図4 培養槽からの排出液での接種菌株の存在比率の推移。培養0日時点でのB株の存在比率が小さい原因は、図3と同様。

個体培養まとめ

個体表面では、単独培養時に増殖速度が小さいと推定される B 株が、共培養では競争優位となることが示された。この結果は、固体表面培養では、株間に何らかの強い相互作用が存在し、競争の結果に対して最大増殖速度よりも強い影響力をもつことを強く示唆している。

本実験の培養期間では競争排除は観察されなかったが、B 株の存在比率が増加する傾向が観察されたことから、培養期間を延ばすことで競争排除が起こる可能性は排除できない。

(3)まとめ

液体培地での共培養では、単独培養時に増殖速度の早い A 株の存在比率が培養時間とともに上昇する傾向が観察され、液体培養では A 株が競争優位となることが明らかになった。本研究の培養期間では、完全な競争排除には至らなかったが、培養期間を延ばすことで、B 株が競争排除される可能性が高いと推定される。

一方、固体表面培養では、固体表面での単独培養で増殖が遅いと推定される B 株が、共培養時には競争優位となることが示された。この結果は、固体表面培養では、何らかの種間相互作用が存在し、競争の結果に強く影響を与えることを示している。本研究の培養期間では、競争排除には至らなかったが、培養期間を延ばすことで、A 株が競争排除される可能性は排除できない。

液体培養条件と個体培養条件で、異なる株が競争優位となることが示された。土壌中においても、土壌溶液と土壌粒子表面では、異なる種が競争優位になると考えられ、このことが土壌中で多種のアモニア酸化細菌の共存を可能とする要因のひとつであると考えられる。

<引用文献>

Tago K, et al. Microbes Environ. 2015. 30:21-8.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

6. 研究組織

(1)研究代表者

大久保 卓 (OKUBO, Takashi)

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・農業環境変動研究センター 物質循環研究領域・JSPS 特別研究員

研究者番号：70749275