

P-144

スイカ畑土壌、谷津田水田土壌から oligotrophic な *Nitrosospira sp.* の分離

○堺 奎介¹, 石川 裕士¹, 郷原 奏波¹, 黒岩 恵¹, 磯部 一夫², 諏訪 裕一¹

¹中大院・理工, ²東大院農

E-mail: a12.rnbb@g.chuo-u.ac.jp

[背景・目的] 土壌や海洋といった実環境のアンモニア濃度はアンモニア酸化微生物 (AOB) の培養に用いられる濃度より非常に低い。環境中では oligotrophic な AOM が優占し、重要であると推察されている。本研究では新規性の高い AOM を純粋分離する戦略として、従来法よりも基質濃度が低い培地を設計した。茨城県阿見町大形のスイカ畑土壌、谷津田水田土壌を接種源とし、0.15-75 mM の NH_4^+ を含む培地を用いて、土壌中の AOM を MPN 計数した。優占する AOM を限界希釈法を用いて純粋分離した。また、純粋分離株の 16S rRNA の全長を解析し、既存株および当研究室でこれまで純粋分離した菌株と比較した。[方法] Suwa ら (1994) の C 基礎培地 (pH 7.6) に、 NH_4^+ を 0.15, 1.5, 75 mM 添加し、それぞれ CU, CL, CH 培地とした。これらを用いて、茨城県阿見町大形のスイカ畑土壌、谷津田水田土壌の AOM を MPN 計数した。さらに、7 度の植え継ぎ、限界希釈法を用いた 2 度の純化を行い、CL 培地から AOB を純粋分離した。Heterotroph の混在試験は Suwa ら (1994) の方法で行った。また、16S rRNA による系統解析を Forward primer と Reverse primer を 4 種ずつ用いて行い、HC-1 株、本研究純粋分離株 5 株の 16S rRNA の全長を決定し系統解析を行った。[結果] 茨城県阿見町大形のスイカ畑土壌、谷津田水田土壌の AOM の MPN 計数値は CH 培地に比べ、CL 培地で 3.5-5.8 倍、CU 培地で 6.3-8.3 倍と oligotrophic な培地で高かった。つまり、oligotrophic な培地で AOM が優占した。CU 培地では優占株の純粋分離には至らなかった。スイカ畑土壌から 3 株、谷津田水田土壌から 2 株の AOM を、CL 培地を用いて純粋分離した。当研究室で純粋分離した *Nitrosospira sp.* HC-1 株 (1)、本研究の純粋分離株 5 株とも 16S rRNA の全長 (1498 bp) を解読し、いずれの株も *Nitrosospira* 属の cluster 3 に類別された。本研究で純粋分離した 5 株は *Nitrosospira sp.* L115 株と 99% の相同性があった。さらに、HC-1 株との相同性が 99% であった。これら 5 株と、HC-1 株はそれぞれ畑土壌、水田土壌、森林土壌と分離源が大きく異なる。このことから、培地成分が同一のときは接種源の土壌の性質が異なっても、同種の菌が分離される傾向があることが示された。以上より新規な株を分離する際、培地組成を変えることが戦略として重要になる。(1) 石川裕士, JSME. 2015. PG-099