

鉄イオン溶出体投入によるヘドロ中の真正細菌の変化

研究代表者 東京海洋大学水圏環境教育学研究室 准教授 佐々木剛

1 緒言

ヘドロは、流れのゆるやかな河川、運河、港湾等の水底に存在する柔らかい泥で、特定有害物質を含み、魚介類を通じて人体に影響を及ぼし、有機物を多量に含み有毒ガスを放ち、魚介類の生息環境を悪化させ、あるいは異臭魚発生の原因となり、過度のたい積により港湾機能を阻害する¹。こうした弊害を防ぐために、石灰²、覆砂³、カキ殻⁴、粘土散布⁵、酸素供給⁶による底質改良試験や浚渫⁷によるヘドロ除去が行われてきた。近年、鉄イオン溶出体⁸を河川河口域の底層に設置することで海水中に2価鉄イオンが供給されヘドロの性状を変化させることが報告されている⁹。山口県立水産高等学校（現大津緑洋高等学校）では、磯焼けが発生した前浜に鉄イオン溶出体を投入することによってアカモクの出現を確認した¹⁰。この結果を受け、長門市内小中学校、漁業共同組合、地元ボランティアならびに東京海洋大学との共同事業として鉄イオン溶出体の作成ならびに散布実験が行なわれている(図1)¹⁰。これらの取り組みは、海外においても日本における草の根の教育活動として発表された¹¹。しかし、鉄イオン溶出体によるヘドロや水質等の水圏環境変化のメカニズム等については不明である。そこで、本研究ではヘドロ中における真正細菌に着目し、ヘドロのみの水槽とヘドロに鉄イオン溶出体を投入した水槽の経時的变化を比較し出現した真正細菌を解析した。



図1 地元ボランティアによる鉄イオン溶出体散布の様子¹⁰

2 材料と方法

2009年4月10日～2010年9月16日、60cm水槽2槽A（図2）、B（図3）に山口県長門市を流れる江の川底層から採取したヘドロ7000gと塩素を除去した水道水47L、同河川上流部から採集した長さ10cmのオオカナダモ8株計10g、B水槽に鉄イオン溶出体100g（図4）3個を投入し経過観察を行った。2010年9月16日に水槽A、Bの底層から沈殿物を採取し試料とした。試料に含まれる真正細菌を明らかにするために、真正細菌クローン解析を行った。真正細菌クローン解析は、2010年11月15日、株式会社J-Bio21（茨城県つくば市）において実施し、ExtrapSoilDNAKitPlusVer.2(J-Bio21)を用いて試料からDNAの抽出・精製を行った。DNA溶液のDNA濃度は、icoGreen dsDNA Assay Kit（Invitrogen）を用いて測定した。



図2 水槽A（ヘドロのみ）

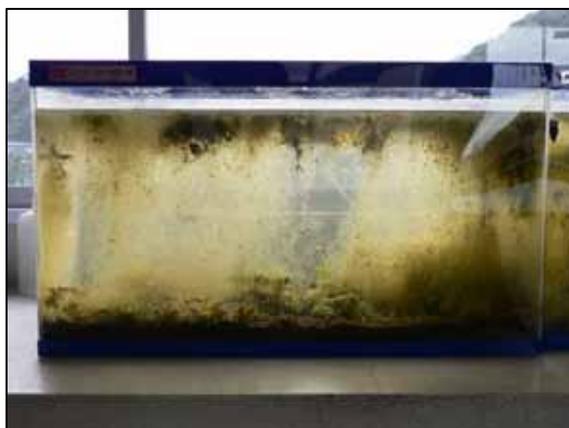


図3 水槽B（ヘドロ+鉄イオン溶出体）



図4 鉄イオン溶出体

3 結果

Table1にDNA濃度測定結果を示した。

Table 1 Results of density measurements of DNA

Sample name	Amount of sample (g)	Liquid measure of DNA after purified(μ /L)	Density of DNA after purified(μ /L)
Tank A (Bottom sludge)	0.5	100	24.1
Tank B (Iron + Bottom sludge)	0.5	100	11.5

これらの精製DNAを鋳型とし、Table 2^{12,13}に示したプライマーを用いて真正細菌由来の16SrRNA遺伝子をPCR増幅した。

Table2 Information of PCR primer name and base length and sequences

	Name	Base length (mer)	Sequence (5' -3')
Specific universal primer of eubacteria	27	20	AGAGTTTGATCMTGGCTCAG
	Bcc1392R	15	ACGGGCGGTGTGTAC

PCRサイクル数は、予めQPrimerPCR¹⁴を行って増幅過程をモニタリングして決定した。PCR反応を早い段階で停止させることで、PCRバイアス^{15,16}やアーティファクト^{17,18,19}

の生成を低減できる。しかし、早く止めすぎるとその後の解析に十分なPCR産物が得られない²⁰ため、QPrimerPCRによるモニタリング結果から、クローニングに十分な産物を得るのに最適なサイクル数を決定した(Table 3)。

Table 3 Results of number of PCR cycles using of liquid concentrate of DNA

Sample name	Number of PCR cycles
Tank A (Bottom sludge)	21
Tank B (Iron + Bottom sludge)	21

上記で得られた真正細菌16SrDNAのPCR増幅産物をクローニングし、各96クローンのシーケンス解析を実施した。シーケンス解析用プライマーは表2の27fを使用し、16SrDNAの塩基配列を解読した。得られたDNA配列を公共のデータベースと照合して相同性検索(BLAST検索)を行い、クローン毎に近縁な細菌種を予測した。

A水槽（ヘドロのみ）の真正細菌分析結果

解析を行った96クローンのうち、90クローンで塩基配列情報を得ることができた。ただし、そのうち12クローンについては真核生物のChloroplast由来だった。Bacteriaでは、*Holophaga*属に近縁なクローン（クローン数：5，相同性：82.3～86.3%）が高頻度に検出された。近縁微生物との相同性が同属の可能性があるとされる96%以上であるクローンは、90クローン中25クローンであった。近縁微生物との相同性が同種の可能性があるとされる99.7%以上であるクローンは、90クローン中1クローンであった。既知微生物との塩基相同性が90%以下のクローンは44クローン検出された。

B水槽（ヘドロ+鉄イオン溶出体）の真正細菌分析結果

解析を行った96クローンのうち、96クローンで塩基配列情報を得ることができた。ただし、そのうち1クローンについては真核生物のChloroplast由来だった。

Bacteriaでは、*Chthoniobacter*属に近縁なクローン（クローン数:9, 相同性:83.6～88.0%）、*Candidatus Magnetobacterium*属に近縁なクローン（クローン数:6, 相同性:88.0～89.6%）が高頻度に検出された。近縁微生物との相同性が同属の可能性があるとされる96%以上であるクローンは、96クローン中12クローンであった。近縁微生物との相同性が同種の可能性があると考えられる99.7%以上であるクローンは、96クローン中0クローンであった。既知微生物との塩基相同性が90%以下のクローンは55クローン検出された。

4 考察

解析の結果、ヘドロのみのA水槽から*Holophaga*属に近縁なクローン（クローン数：5，相同性：82.3～86.3%）が高頻度に検出された。*Holophaga*属には、*Holophaga foetida* gen. nov., sp. nov. が知られトリメトキシベンゾイエイドやシリゲイトのもとで成長し含硫化合物のジメチルサルファイドやメタノチオールを発生させる²¹。ジメチルサルファイドやメタノチオールはともにごく少量でも悪臭を放つため、日本の悪臭防止法ならびに同施行令により特定悪臭物質に指定されている。濃度の高いジメチルサルファイドは、目・皮膚を刺激し、特に濃度が高いと酸欠を起こす²²。また、引火性があり、酸化剤と反応すると火災・爆発の恐れがあり、空気との混合気体は爆発しやすい²²。また、大量に発生すれば揮発性が高いことから地球規模での硫黄循環に関わり、気候変動に影響を及ぼすと考えられている。メタノチオールは、沼などで有機化合物が腐敗することによって生じ、コールタールや原油、及び一部地域の天然ガスにも含まれる²²。

一方、ヘドロに鉄イオン溶出体を加えたB水槽からは、*Chthoniobacter*属に近縁なクローン（クローン数：9，相同性83.6～88.0%）、*Magnetobacterium*属に近縁なクローン（クローン数：6，相同性88.0～89.6%）が高頻度に検出された。

Chthoniobacter 属は *Verrucomicrobia* 門に属し、メタン酸化菌であることが知られ、土壌から空气中へのメタンガス放出を防ぐ働きを持つ²³。*Magnetobacterium* 属

は磁性細菌（走磁性細菌）で、細胞内に鉄が豊富なマグネトソームを持ち、淡水や海洋の土壤中で観察され、硫黄還元生物の有無^{24, 25}や、溶解鉄に依存し出現する²⁶。無酸素域においても生息が確認され、酸素の豊富な水中や土壌ではめったに発見されず、一定の環境のもとで硫化鉄を産し、 Fe_3S_4 、 FeS_2 、 Fe_{1-x}S が細胞内にマグネトソームとして存在することが確認されている²⁷。磁性細菌は、微好氣的酸素呼吸を行い、生育に必要なエネルギーを獲得する一方、嫌気呼吸経路である脱窒経路の酵素群も同時に発現する²⁸。

以上からヘドロに鉄イオン溶出体を投入することにより真正細菌相が変化し河川底層堆積物の環境改善効果の可能性があることが示唆された。今後、真正細菌の単離により鉄イオン溶出体がヘドロを含む河川底層堆積物にどのような変化をもたらすのか、さらなる検証が必要である。

5 謝辞

鉄イオン溶出体は無有産研究所杉本幹生氏の指導のもとで作成され、試料ならびに写真は山口県立大津緑洋高等学校安部豊教諭より提供を受けた。本研究は、JFE21世紀財団の支援を受けて行われた。ここに、甚深の謝意を表す。

6 引用文献

- 1 総理府. 公害白書. 大蔵省印刷局. 東京. 1971
- 2 昭和 53～55 年度赤潮対策技術開発試験報告書（石灰による底質改良試験）. 三重県浜島水産試験場, 浜島, 1979～1981.
- 3 昭和 53～57 年度漁場富栄養化対策技術開発試験報告書（覆砂による底質改良試験）. 高知県水産試験場, 須崎, 1979～1983.
- 4 昭和 55～56 年度赤潮対策技術開発試験報告書（カキ殻による底質改良試験）. 広島県水産試験場, 呉, 1981～1982.
- 5 昭和 53～56 年度赤潮対策技術開発試験（粘度散布による赤潮緊急沈降試験）. 熊本県水産試験場, 1979～1982.
- 6 昭和 56 年度赤潮対策技術開発試験報告書（酸素供給物質による底質改良試験）. 日本エヌ・ユー・エス株式会社, 1983.
- 7 昭和 55 年度赤潮対策技術開発試験報告書（ヘドロしゅんせつ漁場回復等試験）. パシフィック航業株式会社, 1981.

-
- 8 杉本幹生, 杉本至健, 杉本慧子, 杉本由起江. 鉄イオン溶出体. 特開 2007-268511, 2006.
 - 9 杉本幹生. 鉄が地球を救う. 鉄の必須性と糞の重要性 (分解物質) の仮説. 水産について考える会. 2010年10月20日
 - 10 安部豊. 高等学校における水圏環境教育実践-ながとふるさと緑化プロジェクト-. 水圏環境教育研究誌. 2011; 4-1: 115-127.
 - 11 Tsuyoshi Sasaki: What is a prospect of Ocean Literacy Partnership (Division) enhancing Aquatic Marine Environmental (AME) Literacy in TUMSAT?
(<http://www.nmeaweb.org/gatlinburg2010/Documents/2010%20NMEA%20Confere%20Program.pdf> 参照 2012年1月6日)
 - 12 Kanagawa T. Bias and artifacts in multitemplate polymerase chain reactions(PCR). J. Biosci Bioeng. 2003; 96: 317-323.
 - 13 Kurata S, Kanagawa T, Yamada K, Torimura M, Yokomaku T, Kamagata Y, Ryuichiro Kurane R. Fluorescent quenching-based quantitative detection of specific DNA/RNA using a BODIPY® FL-labeled probe or primer. Nucleic Acids Res. 2001; 29: e34.
 - 14 Mathieu-Daude F, Welsh J, Vogt T, McClelland M. DNA rehybridization during PCR: the 'Cot effect' and its consequences. Nucleic Acids Res. 1996; 24: 2080-2086.
 - 15 Meyerhans A, Vartanian JP, Wain-Hobson S. DNA recombination during PCR. Nucleic Acids Res. 1990; 18: 1687-1691.
 - 16 Wang GC, Wang Y. The frequency of chimeric molecules as a consequence of PCR coamplification of 16S rRNA genes from different bacterial species. Microbiology. 1996; 142: 1107-1114.
 - 17 Qiu XY, Wu LY, Huang HS, McDonel PE, Palumbo AV, Tiedje JM et al. Evaluation of PCR generated chimeras: Mutations, and heteroduplexes with 16S rRNA gene-based cloning. Appl Environ Microbiol. 2001; 67: 880-887.
 - 18 Marchesi J. R, Sato T, Weightman A. J, Martin T. A, Fry J. C, Hiom S. J, Dymock D, Wade W. G. Design and evaluation of useful bacterium-specific PCR primers that amplify genes coding for bacterial 16S rRNA. Appl Environ Microbiol. 1998; 64: 795-799.
 - 19 Ritalahti MK, Amos KM, Sung Y, Wu Q, Koenigsberg SS, Lüffler EF. Quantitative PCR targeting 16S rRNA and reductive dehalogenase genes simultaneously monitors multiple Dehalococcoides strains. Appl Environ Microbiol. 2006; 72: 2765-2774.
 - 20 Suzuki MT, Giovannoni, SJ. Bias caused by template annealing in the amplification of mixture of 16S rRNA genes by PCR. Appl Environ Microbiol. 1996; 62: 625-630.
 - 21 Liesack W, Bak F, Kreft JU, Stackebrandt E. *Holophaga foetida* gen. nov., sp. nov., a new, homoacetogenic bacterium degrading methoxylated aromatic compounds. Arch Microbiol. 1994; 162: 85-90.

-
- 22 悪臭法令研究会. ハンドブック悪臭防止法 四訂版. ぎょうせい, 東京. 2001.
 - 23 Islam T, Jensen S, Reigstad JL, Larsen Ø, Birkeland KN. Methane oxidation at 55°C and pH 2 by a thermoacidophilic bacterium belonging to the *Verrucomicrobia* phylum. PNAS. 2008; 105: 300-304.
 - 24 Bazylinski AD, Frankel BR. Magnetosome formation in prokaryotes. Nature Reviews Microbiology. 2004; 2: 217-230.
 - 25 Stefan S, Dennis B. Magnetotactic Bacteria. In: Martin D, Stanley F, Eugene R, Karl-Heinz S. Erko S(eds.). **The Prokaryotes Vol. II*. * Springer Press, New York. 2006; 842-862.
 - 26 STOLZ FJ, CHANG RS, KIRSCHVINK LJ. Magnetotactic bacteria and single-domain magnetite in hemipelagic sediments. Nature. 1986; 321: 849 - 851.
 - 27 Pósfai M, Buseck PR, Bazylinski DA, Frankel RB. Reaction Sequence of Iron Sulfide Minerals in Bacteria and Their Use as Biomarkers. Science. 1998; 280: 880-883.
 - 28 福森義宏. 磁性細菌の生化学. 蛋白質・核酸・酵素. 1995; 40: 919-925.