

フェリハイドライト培地を用いた異化的鉄還元細菌の検出と同定

静岡県立大学環境科学研究所 正会員 ○関川 貴寛
 静岡県立大学大学院環境物質科学専攻 林 広紀
 静岡県立大学環境科学研究所 正会員 岩堀 恵祐

1. 目的

微生物は土壌や堆積物環境中で鉄の酸化還元反応の媒介として重要な役割を果たしている。この酸化還元反応に係わっている鉄酸化細菌と鉄還元細菌は古細菌や細菌の様々な系統に属している。pH が中性付近の嫌気的な環境下では、鉄酸化細菌等により生産された非晶質の酸化鉄を鉄還元細菌が還元し、マグネタイト磁気微粒子($\text{Fe}^{2+}\text{Fe}^{3+}_2\text{O}_4$)を生産する。この非晶質の酸化鉄からマグネタイトを生産することができる細菌は異化的鉄還元細菌と呼ばれている。異化的鉄還元細菌の中でも大きなグループとして知られているのが δ -proteobacteria の *Geobacter* 科細菌である。異化的鉄還元能を有する *Geobacter* 科細菌は環境中に広く生息しており、淡水中や海水中の堆積物、湿地帯、汚染された帯水層など様々な環境中から嫌気培養法や分子生物学的手法によって検出されている。

Geobacter 科細菌は異化的鉄還元能以外にも様々な能力を有しており、近年では微生物燃料電池¹⁾、トリクロロ酢酸の還元的脱塩素化²⁾、ウランに汚染された地下水の浄化、導電性微生物ナノワイヤー³⁾等に関する研究も報告されている。*Geobacter* 科細菌の探索は世界中で行われているが、単離の報告は十数種程度であり、日本国内においては探索および単離の報告は未だ行われていない。

そこで、本研究では、異化的鉄還元能を有する *Geobacter* 科細菌を日本国内の様々な環境中から検出することを目的として、非晶質の酸化鉄であるフェリハイドライトを含む培地と、PCR-DGGE (変性剤濃度勾配ゲル電気泳動) 法を用いて異化的鉄還元細菌の培養および同定を行った。

2. 実験方法

2.1 環境サンプル

環境サンプルの採取場所を図1に示す。静岡市内の巴川(上流, 中流 A, 中流 B)と中河内川, 大沢川, 浜松市内の佐鳴湖の湧水, 富士市内の岳南排水路の計7カ所から環境サンプルを採取した。サンプルは底質と水を合わせて採取し、実験には攪拌, 静置後の上澄みを用いた。

2.2 フェリハイドライト培地

FeCl_3 水溶液を攪拌しながら NaOH を加えて pH7.0 に調整することでフェリハイドライト ($5\text{Fe}^{3+}_2\text{O}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$) を析出させた。その後、遠心分離で回収したフェリハイドライトを蒸留水で洗浄し、遊離している塩化物イオンを除去した。電子受容体としてフェリハイドライト, 電子供与体として酢酸ナトリウムを用いたフェリハイドライト培地で培養を行った。



図1 環境サンプル採取場所

キーワード *Geobacter*, 異化的鉄還元細菌, マグネタイト, フェリハイドライト, PCR-DGGE

連絡先 〒422-8526 静岡市駿河区谷田 52-1 静岡県立大学 環境科学研究所 環境工学研究室 TEL 054-264-5649

2.3 異化的鉄還元細菌の同定

フェリハイドライト培地による培養前後のサンプルから抽出した DNA を GC クランプ付き 341f プライマーおよび 907r プライマーを用いて 16S rDNA の V3~V5 領域 (586 bp) を PCR 装置で増幅し, DGGE 法で泳動後, ゲルからバンドを切り出して DNA を回収した. その後, 回収した DNA の塩基配列を解析し, 日本データバンクの遺伝子配列データベースで相同性検索を行い, 異化的鉄還元細菌の同定を行った.

3. 実験結果

3.1 マグネタイト形成の確認

フェリハイドライト培地に環境サンプルを添加し, 嫌気条件下で 14 日間静置培養を行ったところ, 培養前は暗褐色であったフェリハイドライトがすべての培地において黒色に変化していた. 形成された黒色の物質がマグネタイトであるかどうかを確認するためにネオジム磁石を用いて磁気応答を目視で観察した. その結果, 黒色物質はすべての培地で良好な磁気応答を示した (図 2).

3.2 異化的鉄還元細菌の同定

PCR-DGGE 法を用いて培養 14 日目の培地の菌叢解析を行った結果, それぞれのサンプルの優占種は *Geobacter sulfurreducens* PCA (巴川中流 A: 相同性 100%, 大沢川: 99%, 巴川上流: 100%, 巴川中流 B: 99%, 佐鳴湖湧水: 98%), *Geobacter lovleyi* SZ (岳南排水路: 相同性 97%), *Bacterium* ROME215Asa (中河内川: 相同性 96%) に近縁な細菌であった. 巴川中流 A と大沢川, 巴川上流, 巴川中流 B, 佐鳴湖湧水, 岳南排水路の優占種は *Geobacter* 属細菌に近縁であったが, 中河内川の優占種は *Geobacter* 属細菌ではなく, *Pelobacter* 属細菌および *Desulfuromonas* 属細菌の双方に近縁な細菌であることがわかった. 環境サンプルから検出された *Geobacter* 属細菌と *Pelobacter* 属細菌, *Desulfuromonas* 属細菌はすべて *Geobacter* 科に属する異化的鉄還元細菌であった.

3.3 環境サンプルの水質分析

異化的鉄還元細菌の菌種と生息環境との関係を明らかにするために, 環境サンプル中の水質分析を行った. 表 1 に全有機炭素 (TOC), 全窒素 (T-N), 鉄 (Fe), pH の分析結果を示す. 巴川上流と佐鳴湖湧水, 中河内川 の TOC 値は 1 mg/L 未満であった. 一方, 岳南排水路には家庭や工場からの廃水が流れ込んでいるため, TOC と T-N とともに他のサンプルよりも著しく高い値を示した. 今回, 岳南排水路からのみ *Geobacter lovleyi* SZ の近縁種が検出されたことから, 生育環境が菌種の分布に影響を及ぼしている可能性が示唆された.



図 2 培養 0 日(左)と 14 日目(右)の磁気応答

表 1 環境サンプルの水質分析結果

サンプル	TOC (mg/L)	T-N (mg/L)	Fe (mg/L)	pH
巴川中流 A	4.3	1.3	<0.01	7.48
大沢川	5.9	1.5	<0.01	7.36
巴川上流	<0.05	5.6	<0.01	7.14
巴川中流 B	11.1	2.9	<0.01	6.98
佐鳴湖湧水	0.6	11.1	0.05	7.18
岳南排水路	81.8	48.2	0.11	6.78
中河内川	0.6	2.5	<0.01	7.34

参考文献

- 1) Derek R. Lovley, Microbial Energizers: Fuel Cells That Keep on Going, *Microbe.*, 1, 323-329 (2006)
- 2) Helene De Wever *et al.*, Reductive Dehalogenation of Trichloroacetic Acid by *Trichlorobacter thiogenes* gen. nov., sp. nov., *Appl. Environ. Microbiol.*, 66, 2297-2301 (2000)
- 3) Gemma Regueral *et al.*, Extracellular electron transfer via microbial nanowires, *Nature*, 435, 1098-1101 (2005)