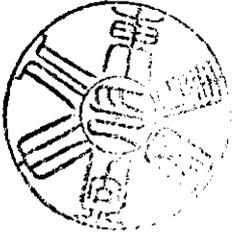


マイクロコズム法による環境変動に対する好酸性細菌群集変化の解析

著者	鹿野 秀一
URL	http://hdl.handle.net/10097/39824



マイクロゾム法による環境変動に対する
好酸性細菌群集変化の解析

課題番号 16570008

平成16年度～平成17年度科学研究費補助金 (基盤研究(C)) 研究成果報告書

平成18年3月

研究代表者 鹿野秀一

(東北大学東北アジア研究センター助教授)

マイクロコズム法による環境変動に対する
好酸性細菌群集変化の解析

課題番号 16570008

平成16年度～平成17年度科学研究費補助金 (基盤研究(C)) 研究成果報告書

平成18年3月

研究代表者 鹿野秀一

(東北大学東北アジア研究センター助教授)

はしがき

本研究は、東北大学東北アジア研究センター助教授鹿野秀一を代表者として、平成16年度、平成17年度の2年間、科学研究補助金（基盤研究(C)）として実施されたものである。研究組織、研究経費、研究発表は以下の通りである。

研究組織

研究代表者： 鹿野秀一（東北大学東北アジア研究センター助教授）

研究分担者： 菊地永祐（東北大学東北アジア研究センター教授）

交付決定額（配分額）

（金額単位：千円）

	直接経費	間接経費	合計
平成16年度	2,300	0	2,300
平成17年度	1,100	0	1,100
総計	3,400	0	3,400

研究発表

（学会誌等）

Doi H, Kikuchi E, Shikano S, and Takagi S. A study of the nitrogen stable isotope dynamics of phytoplankton in a simple natural ecosystem. *Aquatic Microbial Ecology* 36: 285-291. (2004, September 14)

Shikano S, Kikuchi E, Takagi S, and Doi H. Volcanic heat flux and short-term holomixis during the summer stratification period in a crater lake. *Limnology and Oceanography* 49 (6): 2287-2292. (2004, November)

Doi H, Kikuchi E, Takagi S, and Shikano S. Carbon stable isotope ratios of

phytoplankton and benthic diatoms in Lake Katanuma with reference to those of other lakes. Korean Journal of Limnology 38 (special issue): 8-11. (2005, April)

Takagi S, Kikuchi E, Doi H, and Shikano S. Swimming behaviour of *Chironomus acerbiphilus* larvae in Lake Katanuma. Hydrobiologia 548: 153-165. (2005)

Shikano S, Kikuchi E, Takagi S, and Doi H. Interannual variations of limnological and ecological characteristics in acidic Lake Katanuma. Korean Journal of Limnology 38 (4): 435-438. (2005, December)

Doi H, Kikuchi E, Takagi S, and Shikano S. Selective assimilation by deposit feeders: experimental evidence using stable isotope ratios. Basic and Applied Ecology 7: 159-166. (2006, January)

Wakae N, Ishii N, Shikano S. and Uchida S. The influence of paddy soil drying on Te insolubilization by bacteria. Chemosphere in press (2006)

(学会発表)

Shikano S, Kikuchi E, Takagi S, and Doi H. 2004. Interannual variations of limnological and ecological characteristics in acidic Lake Katanuma. Proc. of The First Korea Japan Joint Limnology Symposium, pp. 59. May 19-22, 2004. Pusan National University, Korea.

Doi H, Kikuchi E, Takagi S, and Shikano S. 2004. Carbon stable isotope ratios of phytoplankton and benthic diatoms in Lake Katanuma with reference to those of other lakes. Proc. of The First Korea Japan Joint Limnology Symposium, pp. 17. May 19-22, 2004. Pusan National University, Korea.

Doi H, Kikuchi E, Takagi S, and Shikano S. 2005. Selective assimilation by deposit feeders: experimental evidence using stable isotopes. The Second Japan-Korea

Joint Symposium on Limnology, pp. 87, September 16-18, 2005. Osaka, Osaka
Kyoiku University

鹿野秀一、菊地永祐 潟沼の夏期における一時的全循環イベントのボックスモデル解析 第69回日本陸水学会大会 新潟大学 2004年9月17日-20日

千葉秀樹、鹿野秀一、菊地永祐 強酸性湖における水質変化と細菌群集の変動 第20回日本微生物生態学会大会 東北学院大学 2004年11月21日-23日

野村大祐、鹿野秀一、菊地永祐 強酸性湖潟沼における細菌群集の実験的解析 第20回日本微生物生態学会大会 東北学院大学 2004年11月21日-23日

鹿野秀一、千葉秀樹、高木茂人、土居秀幸、菊地永祐 強酸性湖における成層・循環状態による水質変化の浮遊微生物群集への影響 第52回日本生態学会大会 大阪国際会議場 2005年3月27日-30日

土居秀幸、菊地永祐、鹿野秀一、高木茂人 単純湖沼生態系における植物プランクトンの窒素安定同位体比変動 大阪教育大学 2005年9月18日-21日

鹿野秀一、千葉秀樹、菊地永祐 強酸性湖潟沼における細菌群集の多様性解析 第21回日本微生物生態学会大会 福岡国際会議場 2005年10月30日-11月2日

土居秀幸、菊地永祐、高木茂人、鹿野秀一 底生動物の選択的な餌資源同化-安定同位体比による検討- 第53回日本生態学会大会 朱鷺メッセ(新潟) 2006年3月24日-28日

目次

1. 序論	1
2. 潟沼の水質と <i>Acidiphilium</i> 属と <i>Acidithiobacillus</i> 属の季節変化	4
2-1. はじめに	4
2-2. 材料と方法	4
2-3. 結果	6
2-3-1. 水質の季節変化	6
2-3-2. <i>Acidiphilium</i> 属と <i>Acidithiobacillus</i> 属の バイオマス変化	7
2-4. 考察	7
3. マイクロコズム法による優占細菌属変化の要因解析	10
3-1. はじめに	10
3-2. 材料と方法	11
3-3. 結果	13
2-3-1. マイクロコズム I	12
2-3-2. マイクロコズム II	13
3-4. 考察	14
4. 引用文献	17

1. 序論

水界生態系における細菌群集は、水の物理的・化学的性質によって、構成種、そのバイオマスが変化すると考えられている。しかし多くの湖沼や海洋においては、種組成が極めて多岐に渡っているため、群集組成を把握するには多くの労力を必要とし、更に環境変化に対する細菌群集の応答を解析するのは難しい。これに対して極限的環境下のような、種組成が単純で解析の容易な生態系を研究対象とすることは、環境と生物の間、及び生物間の相互作用を研究する上で有効な手段の一つであると言える。そのような生態系の1つとして、強酸性湖沼（かたぬま）が研究対象として考えられる。

湖沼は宮城県大崎市鳴子地区の南東約1 kmに位置する火口湖で、湖水はpH 2.0から2.3の強い硫酸酸性を示す（Satake and Saijo 1974）。湖の周囲は溶岩丘に囲まれており、また流入、流出河川がなく閉鎖性が高い。湖底からは硫化水素や二酸化炭素等の火山性ガスの供給があるため、成層期には深水層に硫化水素が蓄積し、酸素を消費することにより無酸素水塊が発達する。湖水の循環が生じるとその還元的な湖水が全層に行き渡るため、ごく表層を除き一時的に全層無酸素状態となる（Shikano *et al.* 2004）。一般的な温帯の二循環湖においては、解氷直後の初春に表層が暖められて短期間の全循環が起こった後、晩秋まで長い成層状態を維持し、秋期循環期を経て冬期に結氷により逆成層する（Wetzel 2001）。しかし湖沼においては湖底から熱の供給があるため（佐藤 1995）一般の二循環湖と比べて成層は弱く、夏期の成層期間中であっても一時的な循環を生じることがある。湖沼は初秋の9月には循環期に入り、12月から3月まで湖面は結氷する（Shikano *et al.* 2004）。

湖沼においては、強酸性のため魚類、動物プランクトン、ネクトンなど多くの生物は生息できないが、ユスリカ科のサンユスリカ (*Chironomus acerbiphilus*) の幼虫、底生珪藻の *Pinnularia acidojaponica*、植物プランクトンの *Chlamydomonas acidophila* が高密度で優占している（Satake and Saijo 1974, Takagi *et al.* 2005）。細菌群集については、16S rDNA クローンライブラリー法による細菌組成の季節変化が調べられている（千葉 2004）。千葉（2004）によると、4月から6月の成層期には主に *Acidiphilium acidophilum* の1種が

優占していたのに対して、秋期循環期には *Acidithiobacillus albertensis* 及び *Acidithiobacillus caldus* が増加し *A. acidophilum* と共に 3 種が優占していた。この 3 種以外にも *Acidobacteria* や *Thiobacillus plumbophilus* が循環期には見られた。

しかし 16S rDNA-クローンライブラリー法を用いた場合、16S rDNA のコピー数、DNA 抽出における回収率、PCR の増幅率、クローニングの効率にバイアスがかかるため、環境中の群集組成比を必ずしも正確には表すことができず、半定量的であるという欠点がある。そのため新たに定量的な調査を行い、千葉（2004）の結果を確かめることは重要である。Fluorescent *in situ* Hybridization (FISH) 法は配列の分かっている特定の DNA 若しくは RNA を、蛍光色素でラベルしたプローブとハイブリダイズさせる方法であり、同時に DAPI 染色を施すことで、全菌の中から目的の細菌を定量することができる (Amann *et al.* 1990, Maruyama and Sunamura 2000)。

また、変性剤濃度勾配ゲル電気泳動法 (denaturing gradient gel electrophoresis: DGGE) を細菌群集構造解析へ適用すること (Muyzer *et al.* 1993) が、盛んになって来ている。この方法では、DNA 変性剤 (尿素とホルムアミド) の濃度勾配をつけたアクリルアミドゲル中で電気泳動を行うことにより、長さがほぼ同じ複数種の PCR 産物を塩基配列の違いによってゲル中の異なる位置のバンドとして分離できる。これによりクローニングを行わなくても、細菌群集の構造解析が短時間できる。

潟沼において夏期成層期には *Acidiphilium* 属が優占し、秋期循環期には *Acidithiobacillus* 属が増加することの要因を、野外の調査・観察だけから解明することは難しい。これらの問題を解決するために、実験生態系として、操作性と再現性に優れているマイクロコズム (Shikano and Kurihara 1988, Shahid and Shibin 1997) が多くの研究者によって用いられている。マイクロコズムには、野外の環境サンプルをそのまま培養したり、またその一部を培養液に加えることで誘導した微小生態系と、単独培養できる特定の種を組み合わせで作られた系 (ノトバイオティックマイクロコズム) がある。後者は再現性も高く、初期条件を制御することが容易であるのに対して、前者は正確な構成 (特に細菌群集の構成) が制御できない問題点があるが、より自然界の生態系を代表し

ている実験系を作成できる。

本研究では、FISH 法によって *Acidiphilium* 属と *Acidithiobacillus* 属それぞれのバイオマスの季節変化を調べ、更に潟沼の湖水から作成したマイクロコズムを用い環境要因を操作することによって、どのような環境要因が優占 2 属や他の細菌種の増殖や生存に影響を与えるか明らかにするために、FISH 法による 2 属の定量的な解析と DGGE 法による群集構造について解析を行った。

2. 潟沼の水質と *Acidiphilium* 属と *Acidithiobacillus* 属の季節変化

2-1. はじめに

潟沼において、春期から夏期の成層期には *Acidiphilium acidophilum* の近縁種が優占し、秋季循環には、*Acidithiobacillus caldus* と *At. albertensis* の2種が増加してくると報告されている (千葉 2004)。*Acidiphilium* 属は好酸性、好気性で、従属栄養も可能な硫黄酸化細菌であり、一部にバクテリオクロロフィル *a* を持つ種も報告されている (Kishimoto *et al.* 1995、Burton and Norris 2000、Gonzalez-Toril *et al.* 2003)。*Acidithiobacillus* 属は好酸性、好気性の硫黄酸化細菌もしくは鉄酸化細菌である (Bryant *et al.* 1983, Kelly and Wood 2000)。

千葉(2004)の研究では、16S rDNA クローニングライブラリー法を用いたため、種組成は半定量的に示されたのみであり、定量的なバイオマスの変化は明確には評価されていない。そこで本研究では、16S rDNA の配列を標的とした FISH 法によって、潟沼の水質の季節変化と *Acidiphilium* 属と *Acidithiobacillus* 属のバイオマスの季節変化を定量的に確かめた。FISH 法ではプローブがハイブリダイズできる特定の細菌しか定量することができないが、潟沼では *Acidiphilium* 属と *Acidithiobacillus* 属の2属が細菌群集のほとんどを占めるため、2属にそれぞれ特異的なプローブによる FISH 法によって細菌群集のバイオマスの変化を解析することが可能である。

2-2. 材料と方法

調査地： 潟沼 (かたぬま) は、宮城県大崎市鳴子地区の 38° 44.0' N、140° 43.5' E に位置している火口湖である (図 1)。湖面標高は 306 m で、面積 0.124 km²、最大深度 21 m、平均深度約 5.5 m の楕円形をした湖で、流入河川、流出河川はない。湖底からは硫化水素を含む火山性ガスと地熱が供給されているため、硫化水素の酸化によって生じた硫黄が粒子状となり湖面に浮かんでくる (Satake and Saijo 1978、佐藤 1995)。潟沼の湖水は強い硫酸酸性 (pH 2.0 から 2.3) を示している。

水質およびクロロフィル *a* 量の測定： 水質の調査は 2004 年 3 月から 2005

年 12 月まで結氷期を除き毎月 1 回行った。水質の測定にはマルチ水質モニタリングシステム U-22 (堀場製作所) を用い、水深 0、1、2、3、4、5、6、8、10、13、15 m における各水温、pH、溶存酸素 (DO)、酸化還元電位 (ORP) を潟沼最深部直上において測定した。またバンドーン型採水機を用いて水深 0、2、4、6、10、15 m より採水し、硫化水素濃度を溶存硫化物液体検地管 No. 211 (ガステック) を使用して求めた。同時にクロロフィル a 測定のための採水も行った。クロロフィル a 測定は、採水した湖水をグラスフィルター GF/F (直径 25 mm、Whatman) で吸引濾過した後、ジメチルホルムアミドで抽出し、10-AU Fluorometer (Turner designs) を用いて測定した。

FISH 及び DAPI によるバイオマス計測: 2004 年 5 月 12 日、7 月 3 日、9 月 14 日、11 月 18 日の潟沼最深部直上において、表層 (0 m) とバンドーン型採水機を用いて水深 10 m から採水し、現場において採水した湖水に終濃度 3 % となるようにパラホルムアルデヒドを加え固定した。実験室に持ち帰った後サンプルをポリカーボネート・フィルター (ADVANTEC、孔径 0.2 μm 、直径 25 mm) を用いて吸引ろ過した。フィルターは -20 $^{\circ}\text{C}$ で冷凍保存した。

等分割したフィルターは、*Acidiphilium* 属のプローブ (probeBase.net の S-G-Acdp-821-a-A-24 : 5'-AGCACC CCAACATCCAGCACACAT-3')、*Acidithiobacillus* 属のプローブ (probeBase.net の S-S-Thio-0820-a-A-22 をシーケンス結果に基づき下線の T を C に 1 塩基置換: 5'-ACCAAACATCAGTATC CATCG-3') をそれぞれ用いて FISH 染色を行い、更に DAPI 染色を行った。FISH 用のプローブは、5'末端を Cyc3 で蛍光ラベルした。

染色の方法は Maruyama and Sunamura (2000) の FISH-Direct-Counting 法に準拠した。サンプルを吸引ろ過したフィルターに、ハイブリダイゼーション・ソリューション [1 ml: Poly(A) 1 mg、Probe 1 μl 、ホルムアミド (Sigma) 100 μl 、50 \times Denhardt solution (Sigma) 200 μl 、500 mM SPB (sodium phosphate buffer、pH 7) 100 μl 、2 M NaCl 450 μl 、500 mM EDTA 10 μl 、10% SDS (sodium dodecyl sulfate) 50 μl 、滅菌水 89 μl] を 50 μl 滴下し、46 $^{\circ}\text{C}$ で 4 時間振盪した。次に、フィルターは、50 ml のウォッシュ・ソリューション [1 L: NaCl 52.6 g、10% SDS 10 ml、500 mM SPB 100 ml (pH 7)、滅菌水 890 ml] で、45 $^{\circ}\text{C}$ で 30 分洗浄した。ウォッシュ・ソリューション

を入れ替えて同様にもう一度洗浄した。更に、フィルターは DAPI 溶液 (1 μ g/ml) で 10 分間染色した後、フィルターをプレパラートに乗せ退色防止剤 [1, 4-ジアザビスクロオクタン (Wako) 1 g, PBS (phosphate buffered saline) 10 ml, グリセロール 90 ml] で封入した。落射蛍光顕微鏡 (Nikon Optiphot EFD) を用い、B 励起光 (主波長 495 nm) によって FISH の蛍光を、UV (主波長 365 nm) によって DAPI の蛍光をそれぞれ同一視野においてデジタル写真で撮影し、コンピューター上で ImageJ (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>) によりその面積を測定し、バイオマスとした。観察される細菌のほとんどはほぼ同じ太さの糸状細菌、桿菌であり、よって相対的なバイオマスを面積で代替することが可能であった。フィルターのリプリケートは 3 枚独立に吸引ろ過、染色を行った。2 属のバイオマスの検定には多重比較の Tukey-Kramer 法を用いた。

2-3. 結果

2-3-1. 水質の季節変化

2004 年と 2005 年の潟沼の水温の季節変化を図 2 に示す。3 月には短期間の全循環が見られ、4 月以降徐々に成層が形成された。温度躍層は水深 3-5 m 付近、水深 8-10 m 付近に 2 つ見られ、3 層を成していた。それぞれの層の温度差は 2 $^{\circ}$ C から 3 $^{\circ}$ C 程度であった。春から夏にかけて、気温の上昇に伴い表水層の水温は上昇し、深水層の水温も湖底からの地熱の供給によって上昇した。9 月以降は循環期に入り、その後水温は徐々に低下していった。

溶存酸素 (DO) の季節変化を図 3 に示す。3 月の全循環期において溶存酸素は表層でわずかに検出された (2.1 mg/l) もの、表層を除き全層無酸素状態であった。4 月から 8 月の成層期の水深 5 m 以深の深水層においては、溶存酸素は検出されず無酸素状態であったが、表水層では 6 mg/l から 9 mg/l の溶存酸素が検出された。溶存酸素は 10 月をピークとして 11 月には減少した。

硫化水素濃度の季節変化を図 4 に示す。夏期成層期には主に水深 4 m 以深の深水層に硫化水素が蓄積していた。特に成層期の終わりには水深 15 m で 25 mg/l と高い濃度を示した。秋期循環期になると全層で硫化水素は検出されなくなった。

酸化還元電位の季節変化を図 5 に示す。春期循環期、及び成層期の深水層で

は還元的であった。成層期の表水層は4月では370 mVから380 mVの値を示し徐々に上昇した。成層期後半の表水層及び、秋期循環期には全層で500 mV前後の高い値を示し、酸化的であった。

pHはいずれの季節、深度においても全層で2.2から2.3であり安定していた。

クロロフィル a 量の季節変化を図6に示す。2004年は、循環期の10月と11月の表層で特に高濃度(70.1及び30.9 $\mu\text{g/l}$)であった。9月から11月の循環期では表層から水深15 mまでクロロフィル a が検出された。6月の表層では21.9 $\mu\text{g/l}$ であったが、他の成層期(3月から8月)にはほとんどクロロフィル a は検出されなかった。2005年は8月の表層を除きクロロフィル a 濃度は低かった。

2-3-2. *Acidiphilium* 属と *Acidithiobacillus* 属のバイオマス変化

FISH 及び DAPI 染色によるバイオマス測定の結果を図7に示す。潟沼において、FISH によって観察された2属の形態は主に糸状の細菌であった。5月から11月を通じ *Acidithiobacillus* 属と *Acidiphilium* 属の2属で全細菌のバイオマスの約90%から100%を占めていた。

Acidithiobacillus 属は、成層期の5月と7月にはどちらの水深においてもほとんど存在していなかった。循環期初期の9月の水深0 mと10 mのバイオマスは共に、成層期の5月、7月と比較し有意に増加した。9月と11月では *Acidithiobacillus* 属のバイオマスに大きな変化は観察できなかった。

Acidiphilium 属のバイオマスは、循環期の9月の水深0 m及び10 m共に、成層期の5月の水深0 mと10 mのそれよりも有意に減少していた。成層期の7月と比較しても9月のバイオマスは、同様の傾向がみられた。また5月の水深0 mでは5月の水深10 mも含めた他のいずれと比較しても *Acidiphilium* 属のバイオマスは有意に大きかった。循環期の9月から11月にかけて *Acidiphilium* 属のバイオマスは回復する傾向がみられた。

2-4. 考察

温帯の一般的な湖沼において、春の解氷後、表層が暖められると春期全循環が生じ、春から夏にかけての成層期の発達過程では気温の上昇と共に表水層の

みが暖められて深水層との温度差が次第に大きくなる。夏から秋にかけては逆に表水層が冷却され温度差が小さくなり晩秋に循環が生じる (Wetzel 2001)。しかし潟沼では湖底から地熱の供給があるため、成層期の表水層と深水層の温度差は小さく安定しており、一般の温帯湖沼よりも早い 9 月初旬には表水層が冷却され全循環が生じていた。これは 1998 から 2002 年の 5 年間の潟沼の観測とも一致していた (Shikano *et al.* 2004)。2004 年においても 8 月 10 日と 9 月 14 日の間で全循環が生じ、いったん全層無酸素状態になった後、徐々に溶存酸素が回復していったと予測される。

潟沼における成層・循環状態のサイクルによって、溶存酸素や硫化水素、酸化還元電位等の水質の深度分布も大きく変化し、生息する生物、細菌群集に大きな影響を与えていると考えられる。潟沼では夏期成層期の表水層は溶存酸素を多く含み酸化的であり、深水層には硫化水素が蓄積し無酸素で還元的な環境となっている。秋期循環期は、硫化水素は蓄積せず溶存酸素が全層に広がり、全層酸化的になる (Shikano *et al.* 2004)。サンユスリカ (*Chironomus acerbiphilus*) や *Chlamydomonas acidophila* 等の生物は成層期の表水層の部分に分布し、秋期循環期になると全層に分布を広げると報告されている。(Shikano *et al.* 2005, Takagi *et al.* 2005)。

成層期の 5 月、7 月においては *Acidiphilium* 属が優占して約 90 % 以上の細菌バイオマスを占めていた (図 7)。循環期の 9 月、11 月では *Acidithiobacillus* 属のバイオマスが増加し、主に *Acidiphilium* 属と *Acidithiobacillus* 属から細菌群集は構成され、この 2 属の合計で全細菌のバイオマスの約 90 % 以上を占めていた。特に 9 月には *Acidiphilium* 属のバイオマスが減少し、*Acidithiobacillus* 属のバイオマスが多かった。優占する細菌属が成層・循環状態によって変化していた。このことは千葉 (2004) の分子系統解析の結果と一致し、新たに細菌群集の季節変化を定量的に示すことができたと言える。

Acidiphilium 属は成層期、循環期を問わず年間を通してバイオマスが大きく (図 7)、潟沼の水質に最も適応していると考えられる。*Acidiphilium* 属は好気性化学合成独立栄養だけでなく有機物があると従属栄養も行う好酸性硫黄酸化細菌として、酸性環境の河川や湖沼、温泉等に分布している (Burton and Norris 2000, Gonzalez-Toril *et al.* 2003)。またバクテリオクロフィル a を持ち、光

合成によって成長できる種の存在も報告されている (Kishimoto *et al.* 1995)。このようなことから、好氣的条件で硫黄酸化を行っているだけでなく、光合成や従属栄養を行っている可能性もある。また、*Acidiphilium* 属の中には嫌氣的条件下において Fe^{3+} の還元を行い呼吸に利用するものも報告されているため (Johnson and Bridge 2002)、潟沼の *Acidiphilium* 属も成層期の深水層において鉄還元を行っている可能性がある。

季節的な変化に着目すると、成層期の5月、7月と比較して、循環期初期の9月では、水深0 m と 10 m 共に *Acidiphilium* 属のバイオマスは減少していた (図7)。成層期から循環期初期における水質の変化だけでなく、*Acidithiobacillus* 属の増加、*C. acidophila* の増加が、*Acidiphilium* 属のバイオマスに影響している可能性も考えられる。潟沼において、秋季循環期に *C. acidophila* のブルームがよく観察され (Shikano *et al.* 2005)、それに伴い多量の溶存有機炭素が放出される細菌の群集構造に影響を与えている可能性も考えることができる (Brown *et al.* 2004)。

Acidithiobacillus 属のバイオマスは循環期初期の9月に、成層期の5月及び7月と比較し顕著に増加した (図7)。*Acidithiobacillus* 属は主に好酸性、好氣性の硫黄酸化細菌であり、増殖には溶存酸素の存在、酸化還元電位が 200 から 800 mV の酸化環境が必要であると考えられる。そのため、*Acidithiobacillus* 属は溶存酸素が存在し且つ、湖底からの硫化物が湖水の循環により表層まで行き渡るであろう循環期において増殖したが、一方成層期の表水層では溶存酸素は存在し酸化的条件であるが、硫化水素やその他の還元的硫化物が温度躍層を越えて表水層まで供給されないため、*Acidithiobacillus* 属は生育できなかつたと考えることができる。

このように、鉄イオン、光、水温、有機物、溶存酸素、溶存硫化物といった様々な水質環境の変化が、*Acidiphilium* 属と *Acidithiobacillus* 属のバイオマスの変化を引き起こしていると考えられるが、それらのどれが主な要因となって変化が生じたのかを、野外における水質や2属のバイオマスの測定のみから特定することは難しい。また単一の要因が主なのではなく、複数の要素によって引き起こされる可能性も考えることができる。そのため、次章で述べるような実験系による解析が必要だと考えられる。

3. マイクロコズム法による優占細菌属変化の要因解析

3-1. はじめに

前章より、潟沼において、夏期成層期には *Acidiphilium* 属が、秋期循環期には *Acidiphilium* 属に加え *Acidithiobacillus* 属も優占することが定量的に示された。この章では、潟沼の湖水から作製したマイクロコズムを用いて、前章で示された細菌の優占種の変化の要因を明らかにすることを目的とした。

前章の結果から、*Acidiphilium* 属と *Acidithiobacillus* 属のバイオマスに影響を与える環境要因として、水温、光、グルコース、二価鉄イオン、チオ硫酸イオンが重要であると考えられるので、マイクロコズムを作成し、これらの条件を操作することによる影響を調べた。

マイクロコズムへの操作は次のように行った。1). 一般に水界生物にとって、温度は分布や現存量を決定する主要な要因であると考えられているため、10 °C と 20 °C での培養を行い、2 属への温度の影響を確かめた。2). *Acidiphilium* 属にはバクテリオクロフィルを持つ種や従属栄養が可能な種も存在する (Kishimoto et al. 1995、Burton and Norris 2000、Gonzalez-Toril et al. 2003) ため、光の有無による影響や、有機物濃度の影響も調べる必要がある。3). グルコースは多くの細菌において主要な呼吸基質となっており、特に *Acidiphilium* 属は従属栄養でも増殖することが知られているので、グルコース添加系を作成した。4). *Acidithiobacillus* 属には鉄酸化を行う種も存在するため (Kelly and Wood 2000) 二価の鉄イオン (硫酸第一鉄七水和物) を加え影響を確かめた。5). 2 属は共に硫黄酸化細菌であり、基質としての硫化物の効果を確かめる必要があるため、チオ硫酸イオン (チオ硫酸ナトリウム五水和物) を用いて実験を行った。6). 硫黄酸化をするのには、基質としての硫化物を酸化するために酸素が必要であることから、溶存酸素濃度を低下させたマイクロコズムも作成した。7). 更に、チオ硫酸イオン添加と溶存酸素低下を組み合わせた条件も行った。

本研究のマイクロコズムは、湖水を滅菌したフラスコに入れ培養する方法をとった。作成したマイクロコズムに上記の操作を加え培養したものと無操作で培養したものを、第1章と同様に FISH 法による 2 属バイオマスの変化と、

DGGE 法による 2 属以外の細菌群集の変化を調べ、潟沼の群集構造に影響を与える要因を解析した。

3-2. 材料と方法

湖水の採集：2005 年 8 月 1 日及び 2005 年 10 月 14 日に潟沼最深部直上の表層より採水、2 時間以内に実験室に持ち帰り、マイクロコズム作製の湖水とした。残りの湖水の一部をパラホルムアルデヒドで固定した後、前述のポリカーボネート・フィルターで吸引濾過し、これを培養開始時 (0 日目) のバイオマス測定用のサンプルとした。

マイクロコズムの作製：8 月と 10 月の湖水から作製したマイクロコズムをそれぞれマイクロコズム I とマイクロコズム II とした。持ち帰った湖水は滅菌したフタ付き 100 ml のフラスコに 80 ml ずつ分注し、20 °C、12-12 時間明暗周期、3300 lx で培養したものをコントロール条件とした。操作区として、1). 低温条件 (10 °C)、2). 暗条件 (アルミホイルで二重に覆い遮光)、3). グルコース添加条件 (1 g/l を添加)、4). 硫酸第一鉄添加条件 (0.1 g/l を添加)、5, 6). チオ硫酸ナトリウム五水和物添加条件 (0.1 g/l 添加及び 0.25 g/l 添加の 2 種類)、7). 溶存酸素低下条件 (窒素ガスを 2 L/min で 2 分間吹き込んだ後、滅菌したシリコン栓とパラフィルムで密封)、8, 9). チオ硫酸ナトリウム五水和物添加とさらに溶存酸素を低下させた条件 (0.1 g/l 及び 0.25 g/l の 2 種類) の計 9 種類の条件で培養した。コントロールとそれぞれの操作区は 3 つのリプリケートを作製し、培養 7 日目に培養 0 日目のサンプルと同様、固定、吸引ろ過した。FISH 及び DAPI 染色、バイオマスの計測は前章の方法と同様にして行った。

DGGE 法：マイクロコズムの細菌群集の DNA は次の方法で抽出した。バイオマス測定のために吸引ろ過した後、同様の操作を行った 3 つのマイクロコズムをプールして、約 100 ml サンプルを Sterivex-GS フィルター (Millipore 社、孔径 0.22 μ m) を用いてろ過して、菌体を集めた。Sterivex-GS フィルターの入ったカートリッジに、抽出用バッファー 1.8 ml [0.75 M sucrose, 40 mM EDTA, 50 mM Tris, pH 8.3] と 50 mg/ml lysozyme 40 μ l を加えて、37°C で 30-45 分間インキュベートし、更に 10 mg/ml proteinase K 100 μ l と 20% SDS

100 μ l を加えて、55°C で 1–2 時間インキュベートした。溶解物を、PCI [phenol : chloroform : isoamylalcohol = 25 : 24 : 1] 処理し、更に CIA [chloroform : isoamylalcohol = 24 : 1] 処理して、脂肪壁片やタンパク質等を除去した後、isopropyl alcohol と 70% ethanol で DNA を沈殿させ、TE (10 : 1) バッファー 50 μ l に溶解した。

DGGE 法のための Polymerase chain reaction (PCR) は、GC-clamp (5'-CGCCCGCCGCGCCCCGCGCCCGTCCCGCCGCCCCCGCCCG-3') 付のプライマー GC-341F (5'-GC-clamp-CCTACGGGAGGCAGCAG-3') とプライマー 907R (5'-CCGTCAATTCCTTTGAGTTT-3') をそれぞれフォワード・プライマーとリバース・プライマーとして次のステップダウン法でサーマル・サーキュラー (Perkin Ermaer 9700) を用いて行った (Muyzer *et al.* 1993)。はじめの熱変性は、94°C で 5 分、次に熱変性 94°C で 1 分、アニーリング 65°C で 1 分 (1 回のサイクルごとに 0.5°C ずつ温度を下げる)、伸長 72°C で 1 分のサイクルを 30 回、更に次に熱変性 94°C で 1 分、アニーリング 55°C で 1 分 (伸長 72°C で 1 分のサイクルを 10 回、そして最後の伸長は 72°C で 5 分を行った)。

DGGE 泳動は、DCode (バイオラッド) を用いて、変性剤 (7M 尿素と 40% フォルムアミド) 濃度 20% から 60% の勾配がついた 6% アクリルアミド・ビス (37.5 : 1) ゲルで、0.5 X TAE バッファー (20 mM Tris base, 10 mM sodium acetate, 0.5 mM EDTA) 中で 60°C で 15 時間電気泳動した。SYBR Green I (Molecular Probes) を用いて染色し、バンドパターンを観察した。

ゲル上の主なバンドを、滅菌したパスツールピペットで切り出し、再度 DGGE 用の PCR を行い、単一のバンドであることを確認した後、シーケンス反応 (Applied Biosystems) を行い、Genetic Analyzer ABI PRISM 310 (Applied Biosystems) により塩基配列を決定した。決定した塩基配列は、DDBJ の DNA データベース (<http://www.ddbj.nig.ac.jp/>) と相同性検索 BLAST を行い、近縁種を検索した。

3-3. 結果

3-3-1. マイクロコズム I

マイクロコズム I の結果を図 8 に示す。マイクロコズム I の培養初期の 2 属

のバイオマスの構成比は、*Acidiphilium* 属が約 90 %、*Acidithiobacillus* 属が約 10 %であった。培養開始時（培養 0 日目）と、培養 7 日目のコントロール区で、*Acidithiobacillus* 属のバイオマスにも *Acidiphilium* 属のバイオマスにも有意な差は検出されなかった（t-test、 $p \geq 0.05$ ）。

Acidithiobacillus 属のバイオマスは、コントロール区と比較すると、チオ硫酸ナトリウム 0.25 g/l 添加かつ溶存酸素低下区において有意に大きかった（t-test、 $p < 0.05$ ）。コントロールとの有意な差は検出されなかったが、その他のチオ硫酸ナトリウム添加区、チオ硫酸ナトリウム添加かつ溶存酸素低下、チオ硫酸ナトリウム 0.25 g/l 添加の条件においてバイオマスが大きい傾向がみられた。また、グルコース添加区と溶存酸素低下区でコントロールより有意に減少した。

Acidiphilium 属のバイオマスについては、コントロール条件と比較してチオ硫酸ナトリウム添加区、チオ硫酸ナトリウム添加かつ溶存酸素低下区の 4 つの条件において有意に小さかった。その他の条件ではコントロールとの有意な差は検出されなかった。

マイクロコズム I の DGGE 法によるプロファイルを図 9 に示す。ただし、チオ硫酸ナトリウム 0.25 g/l 添加区からは十分な群集 DNA が抽出できなかったため、これら泳動は行わなかった。培養 0 日目では、*Acidiphilium acidophilum* の近縁種とクロロプラスト由来のバンドが見られたが、コントロールと低温区では *A. acidophilum* のみになっていた。二価鉄添加、暗条件、グルコース添加、低酸素条件では、*A. acidophilum* に加えて、*Acidiphilium* sp. (AY766000) も現れていた。一方、チオ硫酸ナトリウムを添加した時のみ、*Acidithiobacillus caldus* と *At. albertensis* の近縁種のバンドが強く現れ、*Acidiphilium acidophilum* の近縁種のバンドが見えなくなった。

3-3-2. マイクロコズム II

マイクロコズム II の結果を図 10 に示す。マイクロコズム II の培養初期の 2 属のバイオマスの構成比は、*Acidiphilium* 属が約 20 %、*Acidithiobacillus* 属が約 40 %であった。培養 0 日目と、培養 7 日目のコントロール区で、*Acidithiobacillus* 属のバイオマスにも *Acidiphilium* 属のバイオマスにも有意な差は検出されな

った (t-test、 $p \geq 0.05$)。

Acidithiobacillus 属のバイオマスについては、コントロール条件と比較して 10 °C の低温条件とチオ硫酸ナトリウム添加 0.1 g/ml かつ溶存酸素低下区において有意に大きかった (t-test、 $p < 0.05$)。その他の条件ではコントロールとの有意な差は検出されなかった。

Acidiphilium 属のバイオマスについては、コントロール条件と比較してチオ硫酸ナトリウムを添加した 4 つの条件でバイオマスがほぼ 0 になり、有意に小さかった。

マイクロコズム II の DGGE 法によるプロファイルを図 11 に示す。培養 0 日目では、*A. acidophilum* と *At. caldus* の近縁種とクロロプラスト由来のバンドが見られたが、コントロール、二価鉄添加、暗条件、グルコース添加、低酸素条件では、クロロプラスト由来のバンドは見えなくなり、*A. acidophilum* に加えて、*Acidiphilium* sp. (AY766000) も現れていた。低温区では *Acidiphilium* sp. (AY766000) は出現しなかった。一方、チオ硫酸ナトリウムを添加した 4 つの条件では、*A. acidophilum* のバンドがなくなり、*At. caldus* のバンドが相対的に強くなったが、マイクロコズム I で現れた *At. albertensis* は増加していなかった。

3-4. 考察

マイクロコズム I とマイクロコズム II は共に、培養 0 日目と、培養 7 日目のコントロール条件との間の 2 属のバイオマスに有意な差が検出されなかったこと (図 8、10) から、7 日間のフラスコによる培養自体の細菌組成に対する影響は少なかったものと考えられる。

チオ硫酸ナトリウムを添加した 4 つの条件で、*Acidiphilium* 属のバイオマスは、マイクロコズム I とマイクロコズム II においても小さい傾向がみられ、マイクロコズム II とともに減少したことから、潟沼に生息する *Acidiphilium* 属は、チオ硫酸イオンに対する耐性が低いことが考えられる。他の可能性としては、チオ硫酸ナトリウムを加えたことによってマイクロコズム I では、*Acidithiobacillus* 属が増加したことによる種間競争の影響も考えられる。また、マイクロコズム I のチオ硫酸ナトリウムを添加した 4 つの条件で全菌量が

小さいのは、*Acidiphilium* 属のバイオマスが大きく減少したことが原因であると考えられる (図 8)。*Acidithiobacillus* 属のバイオマスは、マイクロコズム I でチオ硫酸ナトリウム 0.25 g/l 添加かつ溶存酸素を低下させた条件、マイクロコズム II でチオ硫酸ナトリウム 0.1 g/l 添加かつ溶存酸素を低下させた条件においてコントロールと比較して有意に大きく、チオ硫酸ナトリウムを添加したそれ以外の 3 つの条件でも大きい傾向がみられたため (図 8)、*Acidithiobacillus* 属はチオ硫酸イオンを基質として硫黄酸化を行い、増殖した可能性が考えられる。このように、チオ硫酸添加条件において *Acidiphilium* 属のバイオマスが小さいが、*Acidithiobacillus* 属のバイオマスは変化しないか増加したため、2 属の全菌に占める割合は培養開始時と比べて変化した。チオ硫酸イオン濃度は、2 属のバイオマスに変化を及ぼす重要な環境要因であると考えられる。

Acidithiobacillus 属のバイオマスが、マイクロコズム I のグルコース添加区でコントロールに比べて有意に減少していた (図 8) ことは、グルコースと *Acidiphilium* 属の存在下で *Acidithiobacillus* 属の成長が抑制されるという報告 (Marchand and Silverstein 2002) と一致する。

Acidithiobacillus 属のバイオマスは、マイクロコズム I では溶存酸素濃度低下区で有意に減少していた (図 8)。*Acidithiobacillus* 属は好気性細菌 (Bryant *et al.* 1983、Burton and Norris 2000、Gonzalez-Toril *et al.* 2003) であるために、低溶存酸素濃度で増殖ができなかった可能性もあるが、マイクロコズム II においてはチオ硫酸ナトリウムを添加しかつ溶存酸素を低下した条件と、同量のチオ硫酸ナトリウムを添加したのみの条件を比較してみると、有意な差は検出されなかったため (t-test、 $p \geq 0.05$)、*Acidithiobacillus* は、低い溶存酸素濃度でも硫黄酸化を行うことができることが考えられる。

Acidithiobacillus のバイオマスは、マイクロコズム II で低温区において有意に大きかった。*Acidithiobacillus* 属の最適温度は *A. caldus* 45 °C、*A. albertensis* で 28 から 30 °C であるが (Kelly and Wood 2000)、潟沼に生息する *Acidithiobacillus* 属はこれら 2 種とは水温の低下に伴い増加することから、今までの報告とは異なる低温に強い種である可能性も考えられる。

Acidiphilium 属にはバクテリオクロフィルを持つものや溶存有機物を使って従属栄養を行う種がいるが、遮光条件とグルコース添加条件では、マイクロ

コズム I とマイクロコズム II で *Acidiphilium* 属のバイオマスに共にコントロールと比べて差はなく、潟沼に生息する *Acidiphilium* 属は光合成や従属栄養は行っていない可能性が示唆された。

硫酸鉄添加条件に関して、マイクロコズム I においてもマイクロコズム II においてもコントロールと比較した 2 属のバイオマスに差はみられなかったため、鉄イオン濃度は 2 属のバイオマスの変化を引き起こす環境要因ではないことが示唆された。

DGGE 法による結果では、マイクロコズム I のチオ硫酸ナトリウムを添加区で *A. acidophilum* のバンドが確認できなかった点以外は、FISH 法の結果と一致していた。更に、DGGE 法では *Acidiphilium* 属は *A. acidophilum* に近縁な 1 種だけでなく *Acidiphilium* sp. (AY766000) に近縁な種も存在し、条件によっては増加することが分かった。また、*Acidithiobacillus* 属はバイオマスが小さいところ (マイクロコズム I) からチオ硫酸ナトリウムを添加によって増加するときには、*Acidithiobacillus caldus* に近縁な種だけでなく、*At. albertensis* に近縁な種も増加することが、DGGE 法を行うことよって確認できた。DGGE 法による解析からは、*Acidiphilium* 属と *Acidithiobacillus* 属以外にはソウ類由来のクロロプラストのバンドしか見られず、グルコースを添加してもこれらの 2 属以外の細菌種が増加していないことから、潟沼は強酸性のため生育可能な細菌が制限されていると考えられる。

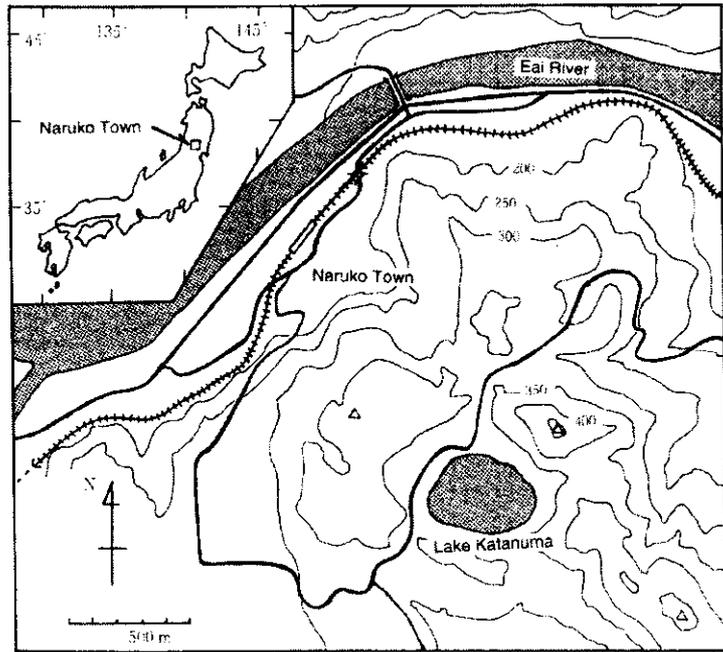
以上のように、チオ硫酸ナトリウムが、2 属のバイオマスに変化を引き起こす重要な要素であることが示唆された。チオ硫酸イオンによって *Acidiphilium* 属のバイオマスは減少する一方で、*Acidithiobacillus* 属のバイオマスは変わらないか増加した。実際の潟沼においても、循環期の初期にそれまで成層期の深水層に蓄積していた硫化水素が酸化され、硫化物が全層に供給される時期に、*Acidithiobacillus* 属のバイオマスが増加し、*Acidiphilium* 属のバイオマスが減少していること一致すると考えられる。

4. 引用文献

- Amann R, Krumholz L, and Stahl DA. 1990. Fluorescent-oligonucleotide probing of whole cells for determinative, phylogenetic, and environmental studies in microbiology. *J. Bacteriol.* 172:762-770.
- Beyers RJ. 1963. The metabolism of twelve aquatic laboratory microecosystems. *Ecol. Monogr.* 33: 281-306.
- Brown A, McKnight DM, Chin Y, Roberts EC, and Uhle M. 2004. Chemical characterization of dissolved organic material in Pony Lake, a saline coastal pond in Antarctica. *Marine Chemistry* 89:327-337.
- Bryant RD, Mcgroarty KM, Costerton JW, and Laishley EJ. 1983. Isolation and characterization of a new acidophilic *Thiobacillus* species (*T. albertis*). *Can. J. Microbiol.* 29:1159-1170.
- Burton NP, and Norris PR. 2000. Microbiology of acidic, geothermal springs of Montserrat: environmental rDNA analysis. *Extremophiles* 4: 315-320.
- 千葉秀樹 2004. 強酸性湖における水質と細菌群集の季節変化. 東北大学生命科学研究科 修士論文.
- Gonzalez-Toril E, Llobet-Brossa E, Casamayor EO, Amann R, and Amils R. 2003. Microbial ecology of an extreme acidic environment, the Tinto River. *Appl. Environ. Microbiol.* 69:4853-4865.
- Johnson DB, and Bridge TAM. 2002. Reduction of ferric iron by acidophilic heterotrophic bacteria: evidence for constitutive and inducible enzyme systems in *Acidiphilium* spp. *J. Appl. Microbiol.* 92:315-321.
- Kelly DP, and Wood AP. 2000. Reclassification of some species to *Thiobacillus* to the newly designated genera *Acidithiobacillus* gen. nov., *Halothiobacillus* gen. nov. and *Thermithiobacillus* gen. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 50:511-516.
- Kishimoto N., Fukaya F, Inagaki K, Saugio Y, Tanaka H, and Tano T. 1995. Distribution of bacteriochlorophyll a among aerobic and acidophilic bacteria and light-enhanced CO₂-incorporation in *Acidiphilium rubrum*. *FEMS Microbiol. Ecol.* 16: 291-296.

- Marchand EA, and Silverstein J. 2002. Influence of heterotrophic microbial growth on biological oxidation of pyrite. *Environ. Sci. Technol.* 36:5483-5490.
- Maruyama A, and Sunamura M. 2000 Simultaneous direct counting of total and specific microbial cell in seawater, using a deep-sea microbe as target. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 2211-2215.
- Muyzer G, De Waal EC, and Uitterlingen AG. 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* 59:695-700.
- Satake K, and Saijo Y. 1974. Carbon dioxide content and metabolic activity of microorganisms in some acid lakes in Japan. *Limnol. Oceanogr.* 19:331-338.
- Satake K, and Saijo Y. 1978. Mechanism of lamination in bottom sediment of the strongly acid Lake Katanuma. *Arch. Hydrobiol.* 83: 429-442.
- 佐藤五郎 1995. 鳴子火山・濁沼における水温・水質の形成機構. *水環境学会誌* 18: 829-836
- Shahid N, and Shubin L. 1997. Consumer species richness and autotrophic biomass. *Ecology.* 79: 2603-2615.
- Shikano S, and Kurihara Y. 1988. Analysis of factors controlling responses of an aquatic microcosm to organic loading. *Hydrobiologia* 169: 251-257.
- Shikano S, Kikuchi E, Takagi S, and Doi H. 2004. Volcanic heat flux and short-term holomixis during the summer stratification period in a crater lake. *limnol. Oceanogr.* 49:2287-2292.
- Shikano S, Kikuchi E, Takagi S, and Doi H. 2005. Interannual Variation of Limnological and Ecological Characteristics in Acidic Lake Katanuma. *Korean J. Limnol.* 38:435-438.
- Takagi S, Kikuchi E, Doi H, and Shikano S. 2005. Swimming behaviour of *Chironomus acerbiphilus* larvae in Lake Katanuma. *Hydrobiologia* 548:153-165.
- Wetzel RG. 2001. *Limnology: Lake and river ecosystems*, 3ed. Academic Press.

(A)



(B)

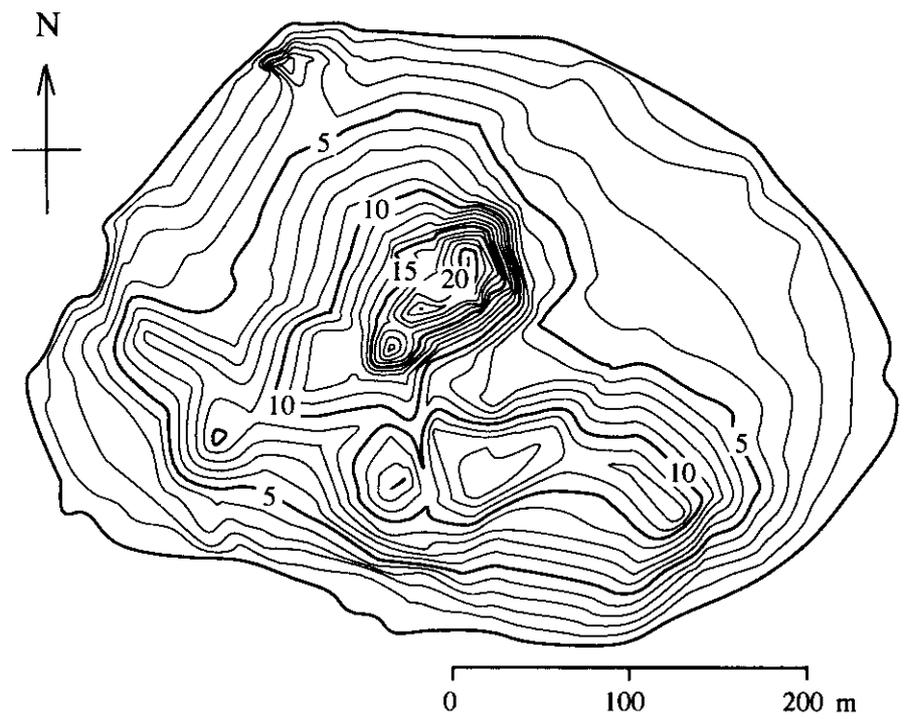


図1. 潟沼の位置 (A) と湖盆形態 (B)。

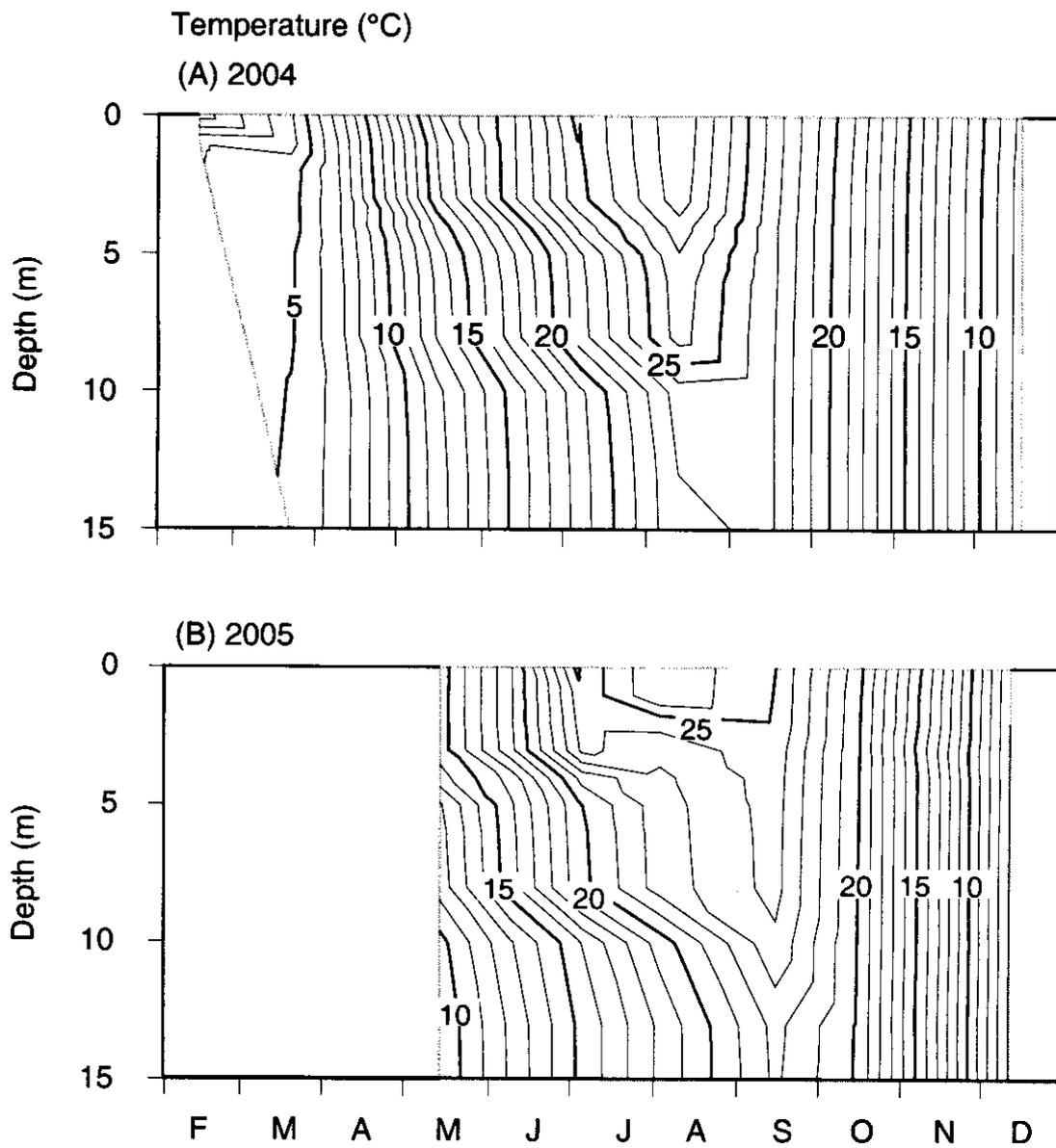


図2. 潟沼における2004年(A)と2005年(B)の水温垂直分布の季節変化。

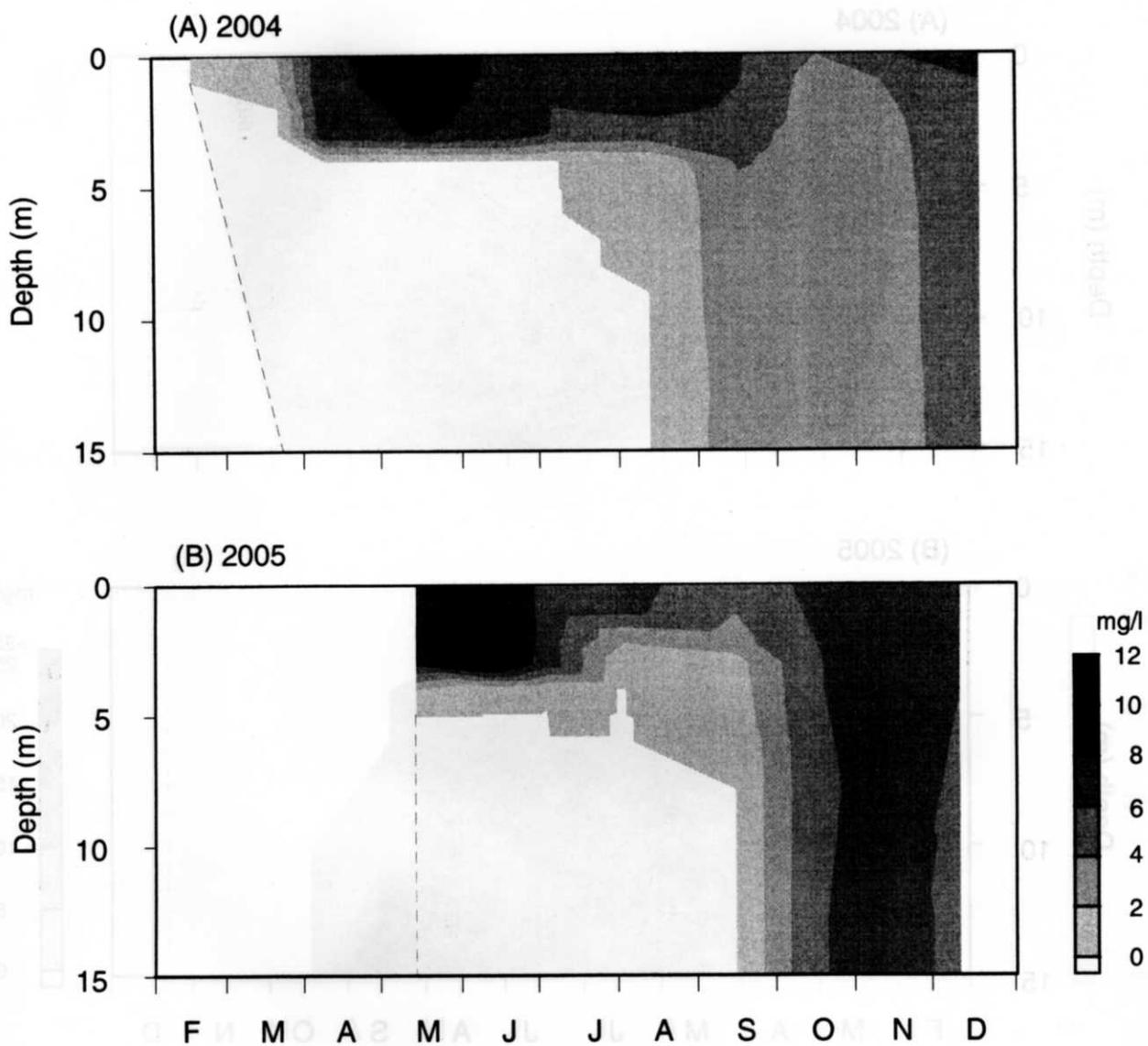


図3. 潟沼における2004年(A)と2005年(B)の溶存酸素濃度の季節変化。

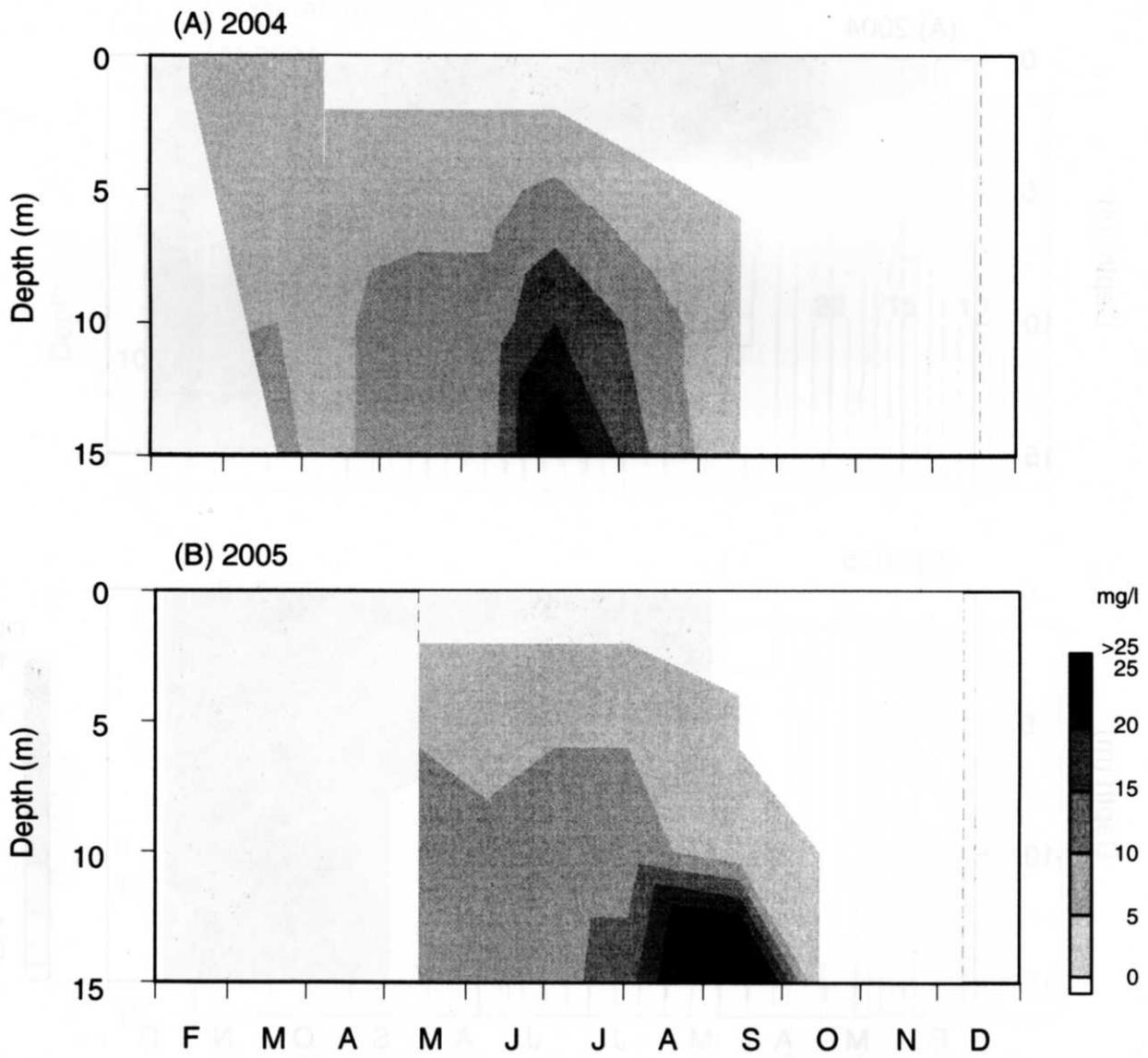


図4. 潟沼における2004年(A)と2005年(B)の硫化水素濃度の季節変化。

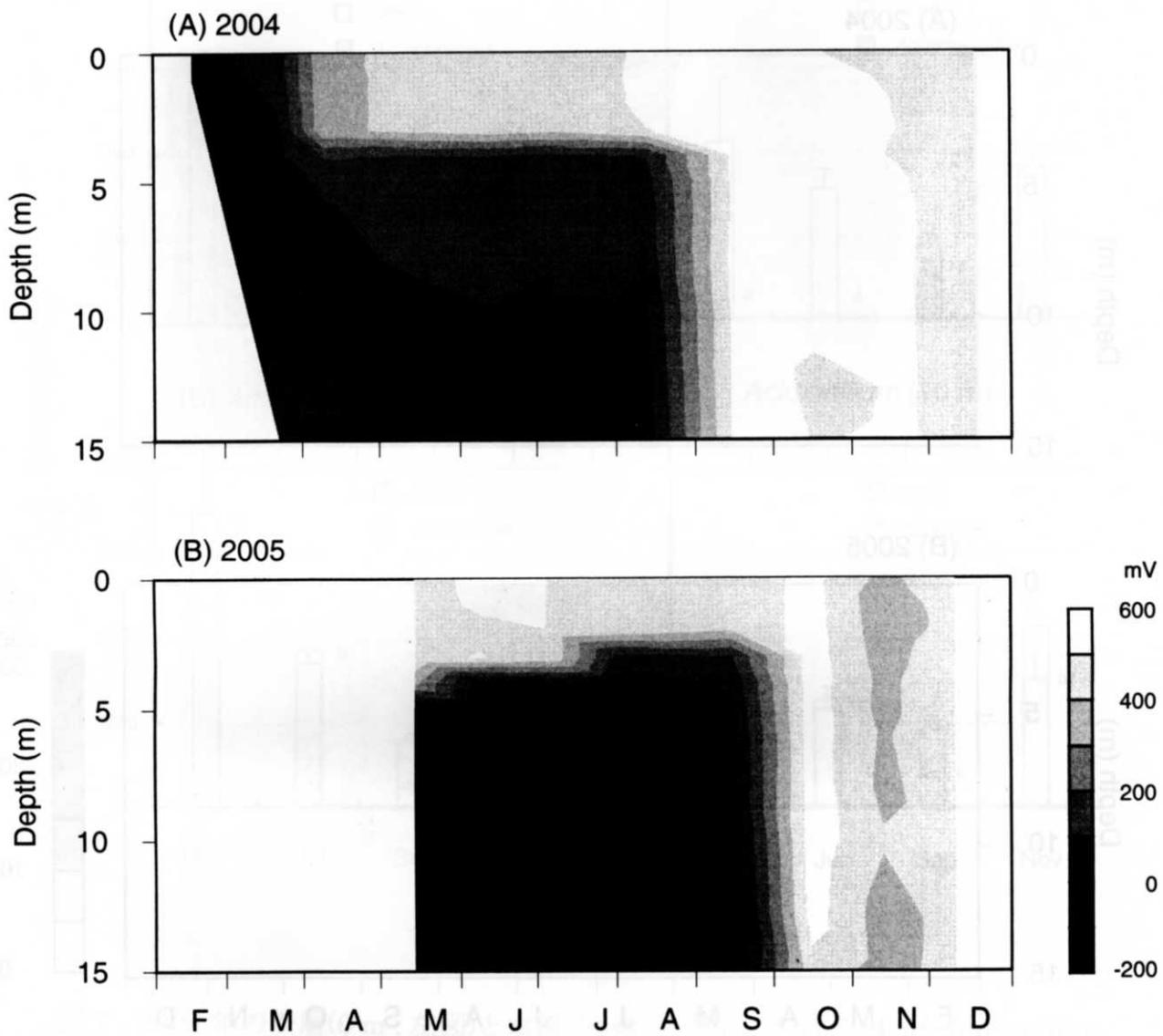


図5. 潟沼における2004年(A)と2005年(B)の酸化還元電位の季節変化。

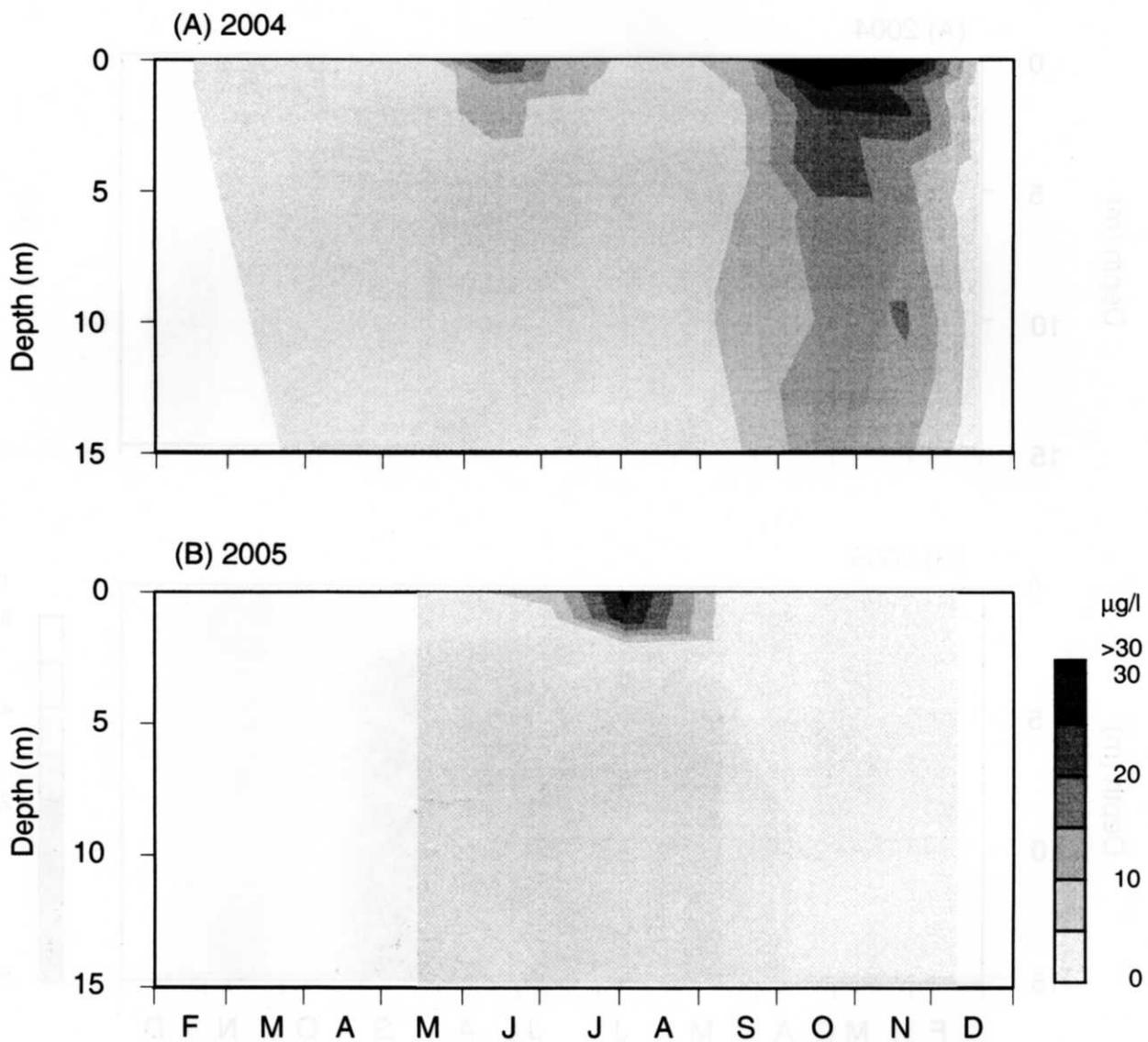


図6. 潟沼における2004年(A)と2005年(B)のクロロフィルa濃度の季節変化。

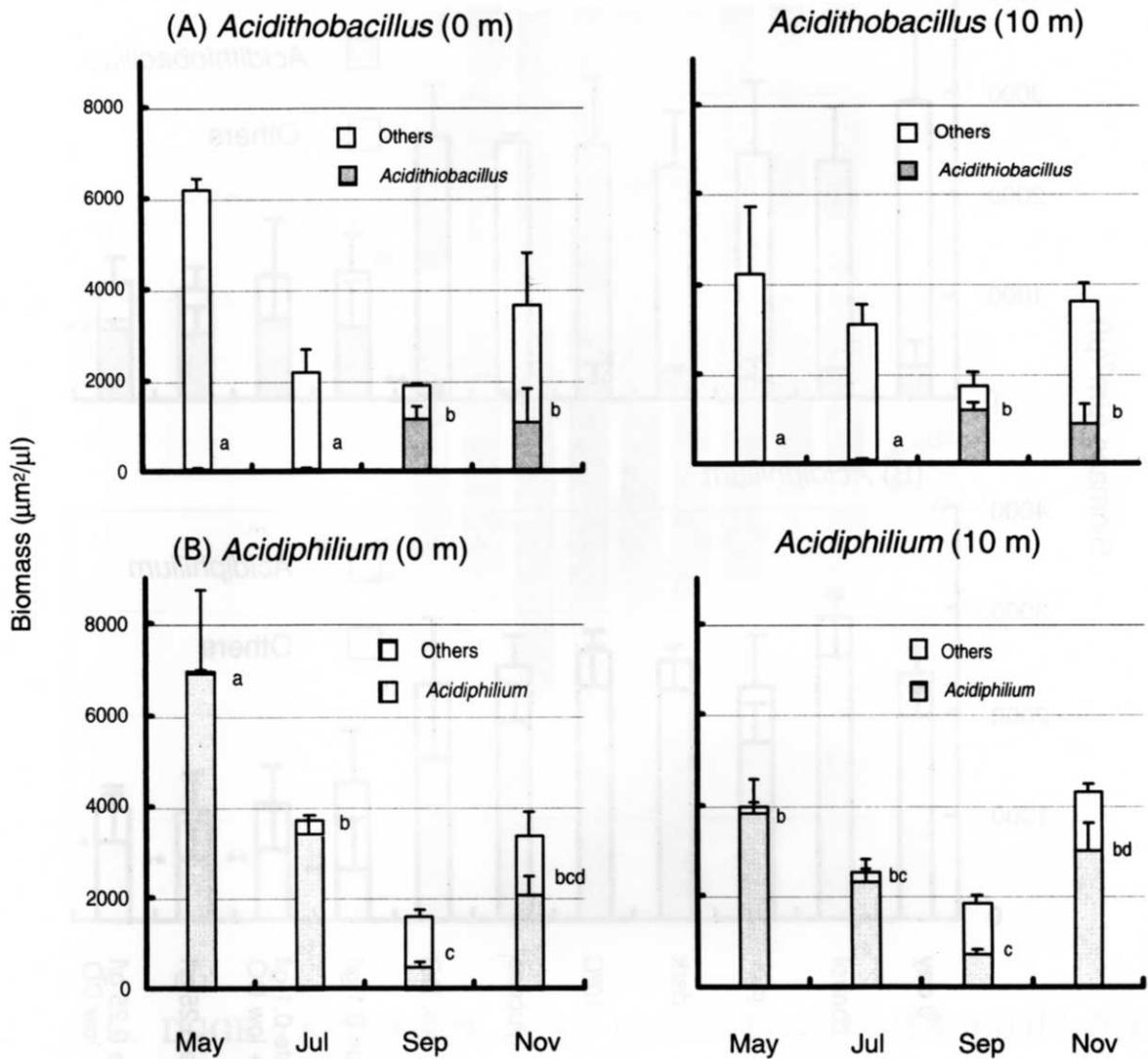


図7. 2004年の表層(0 m; 左図)と水深10 m (右図)における *Acidithiobacillus* 属と *Acidiphilium* 属のバイオマスの季節変化。(A) *Acidithiobacillus* 属とそれ以外のバイオマスと、(B) *Acidiphilium* 属とそれ以外のバイオマス。灰色のバーは FISH 染色のバイオマスを、白色のバーは DAPI 染色バイオマスから FISH 染色のバイオマスを引いた値。誤差線は標準偏差を示す(n = 3)。異なるアルファベットは FISH 染色のバイオマスに有意な差があることを示す($p < 0.05$)。

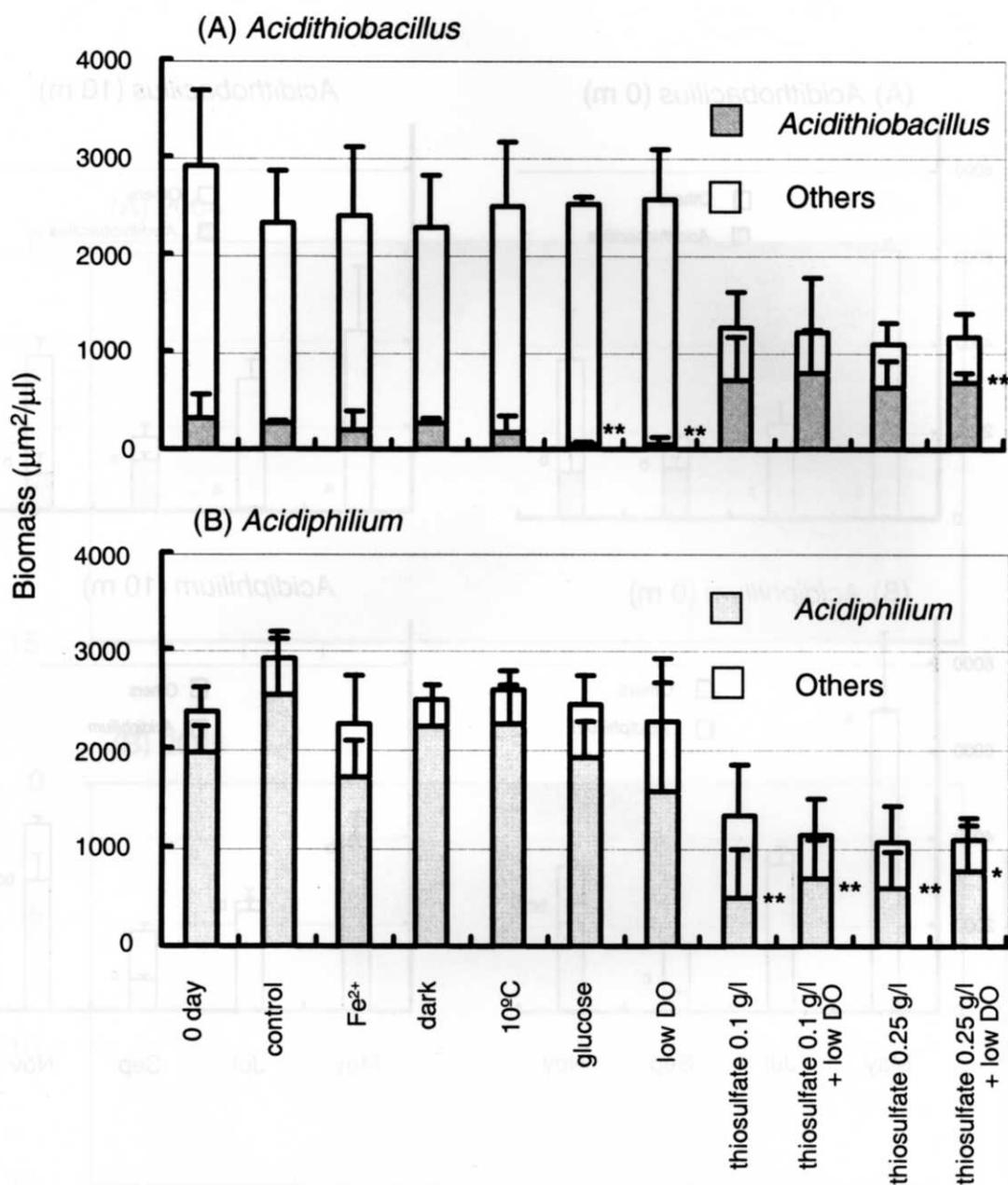


図 8. マイクロコズム I における培養 0 日目と各操作区の培養 7 日目の *Acidithiobacillus* 属と *Acidiphilium* 属のバイオマス。(A) *Acidithiobacillus* 属とそれ以外のバイオマスと、(B) *Acidiphilium* 属とそれ以外のバイオマス。灰色のバーは FISH 染色のバイオマスを、白色のバーは DAPI 染色バイオマスから FISH 染色のバイオマスを引いた値。誤差線は標準偏差を示す(n = 3)。異なるアルファベットは FISH 染色のバイオマスに有意な差があることを示す(*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$)。

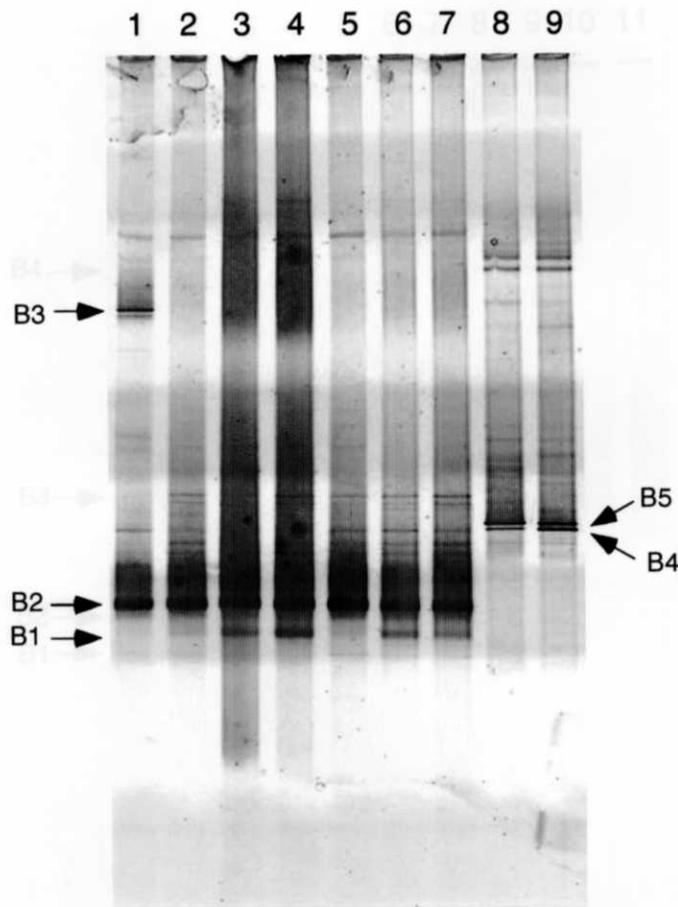


図9. DGGE ゲルの反転画像。マイクロコズム I における培養 0 日目と各操作区の培養 7 日目のバクテリアの 16S rDNA 断片の PCR 産物を泳動したものの。1. 培養 0 日目、2. コントロール、3. 鉄添加、4. 低温条件、5. 暗条件、6. グルコース添加、7. 低酸素条件、8. チオ硫酸ナトリウム 0.1 g/l 添加、9. チオ硫酸ナトリウム 0.1 g/l 添加+低酸素条件、10. チオ硫酸ナトリウム 0.25 g/l 添加、11. チオ硫酸ナトリウム 0.25 g/l 添加+低酸素条件の各操作区。各バンドの近縁種は、B1: *Acidiphilium* sp. (AY766000), B2: *Acidiphilium acidophilus* (D86511), B3: クロロプラスト由来 (AY702136), B4: *Acidithiobacillus caldus* (DQ347502), B5: *Acidithiobacillus albertensis* (AJ459804)。

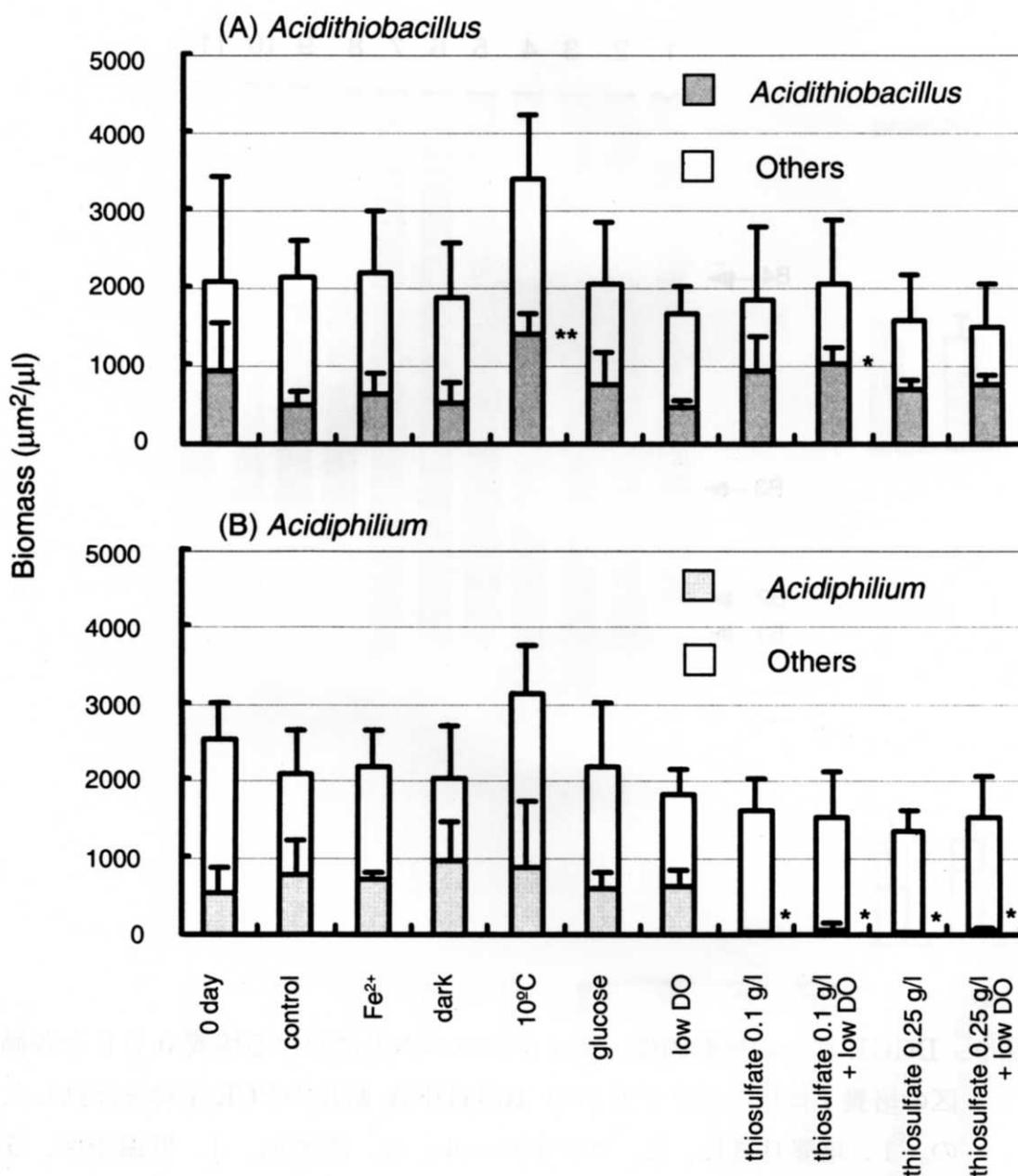


図 10. マイクロコズム II における培養 0 日目と各操作区の培養 7 日目の *Acidithiobacillus* 属と *Acidiphilium* 属のバイオマス。(A) *Acidithiobacillus* 属とそれ以外のバイオマスと、(B) *Acidiphilium* 属とそれ以外のバイオマス。灰色のバーは FISH 染色のバイオマスを、白色のバーは DAPI 染色バイオマスから FISH 染色のバイオマスを引いた値。誤差線は標準偏差を示す(n = 3)。異なるアルファベットは FISH 染色のバイオマスに有意な差があることを示す(*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$)。

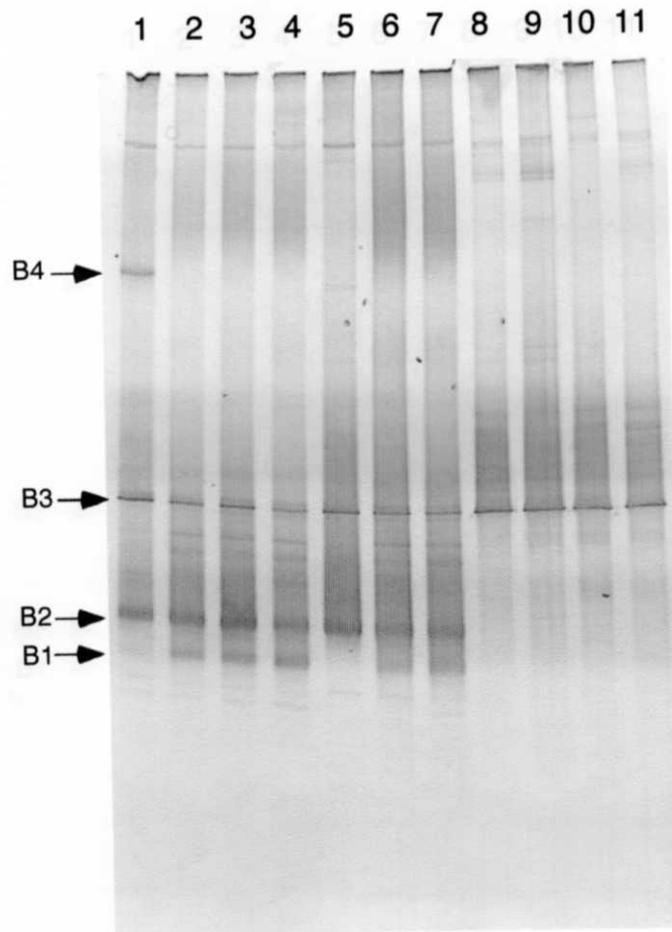


図 1 1. DGGE ゲルの反転画像。マイクロコズム II における培養 0 日目と各操作区の培養 7 日目のバクテリアの 16S rDNA 断片の PCR 産物を泳動したもの。1. 培養 0 日目、2. コントロール、3. 鉄添加、4. 低温条件、5. 暗条件、6. グルコース添加、7. 低酸素条件、8. チオ硫酸ナトリウム 0.1 g/l 添加、9. チオ硫酸ナトリウム 0.1 g/l 添加+低酸素条件、10. チオ硫酸ナトリウム 0.25 g/l 添加、11. チオ硫酸ナトリウム 0.25 g/l 添加+低酸素条件の各操作区。各バンドの近縁種は、B1: *Acidiphiliu* sp. (AY766000), B2: *Acidiphilium acidophilus* (D86511), B3: *Acidithiobacillus caldus* (DQ347502), B4: クロロプラスト由来 (AY702136)。