HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	尾瀬ヶ原に現れるアカシボと鉄・マンガン酸化細菌
Author(s)	横山, 亜希子; 滝, 玲加; 大鐘, 由加子 他
Citation	低温科学, 70, 67-73
Issue Date	2012-03-31
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/49043
Type	departmental bulletin paper
File Information	LTS70_009.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

低温科学 70 （2012） 67-73

尾瀬ヶ原に現れるアカシボと鉄・マンガン酸化細菌

横山亜希子[1)]，滝　　玲加[2)]，大鐘由加子[3)]，八木　明彦[1)]

2011 年 12 月 23 日受付，2012 年 1 月 18 日受理

尾瀬ヶ原にて 5 月の融雪時に雪の表面が赤褐色化する現象を地元の人はアカシボと呼んでいる．尾瀬ヶ原は泥炭質で，鉄はフミン質などと錯体を形成し，地下水に溶存態鉄として豊富に含まれている．この溶存態鉄が酸化され懸濁態鉄になる過程がアカシボ現象に作用していると考えられる．このアカシボ現象を鉄・マンガン酸化細菌の面から解明することを目的とした．室内実験にて，鉄酸化細菌を 20℃，4℃，0℃で培養し，溶存態鉄の減少に伴い懸濁態鉄の増加，溶存性有機物減少，細菌数増加の経日変化がみられた．このことから雪や融雪中の低温環境においても鉄酸化細菌は強い酸化力をみせ，アカシボ現象の要因の一つであることが考えられた．

Involvement of iron and manganese oxidation bacteria in Akashibo appearing at Ozegahara

Akiko Yokoyama[1], Reika Taki[2], Yukako Ogane[3], Akihiko Yagi[1]

Akashibo is a name people in the area use to describe a phenomenon by which the surface of snow acquires a reddish-brown-black color in the snowmelt in May of every year. People in the area call it Akashibo. Dissolved iron is richly contained in the groundwater of Ozegahara. Our objective was to explain this Akashibo phenomenon by the contribution of the iron and manganese oxidation bacteria. From our laboratory experiments, iron oxdation bacteria were cultivated at 20 ℃, 4 ℃, and 0 ℃. As a result, the particulate iron and bacteria increased and the dissolved iron decreased with the decrease of the dissolved organic carbon. The Akashibo phenomenon is regarded as dependent on the involvement of the bacteria by which iron oxidation is actively carried out even at low temperatures.

キーワード：アカシボ，鉄酸化細菌，低温培養
Akashibo, Iron oxdation bacteria, Low-temperature Bacterial culture

1. はじめに

尾瀬ヶ原では例年 5 月の融雪時，雪の表面が赤褐色化する現象が起こる．これを地元の人々は〝アカシボ〟と呼んでいる．尾瀬ヶ原に発生するアカシボ現象は，ほぼ毎年同じ場所で水の流れに沿って発生し，アカシボの形成は融雪水の流れと関係していると推定している（山本ほか，2006）．また，雪が着色する現象は尾瀬ヶ原だけでなく，東北地方の湿原や水田でも融雪時に見られる（山本ほか，2004；大高ほか，2008）．アカシボの原因として，小林・福島（1952）は，湿原の露出した地表に多い赤色の鉄分が毛細現象によりその上を覆う雪中に上昇して鉄錆色によるとした．Fukuhara et al. (2002) は，酸化鉄を付着させた緑藻類の一種（*Hemitoma* sp.）の休眠胞子が赤褐色粒子の原因とした．また，山本ほか (2006) は，雪の中に存在する赤褐色粒子と全鉄濃度のとの間に高い相関があることを報告した．これらからアカシボ現象について鉄の存在が重要であることは明らかである．

自然環境中において鉄分を多く含む水中（地下水，井戸水，湖水，鉱山排水等）に鉄酸化細菌の存在が認められ，日本では主に，地下水，鉱山排水から *Gallionera*

1）愛知工業大学工学研究科；責任著者，八木明彦
E-mail: yagi@aitech.ac.jp
2）静岡県静岡市
3）元-株式会社　エステム
[1] Aichi Institute of Technology, Yachikusa Yakusa, Toyota, Aichi, Japan
[2] Shizuoka, Shizuoka, Japan
[3] Formerly of-Stem. co., Minamiku, Nagoya, Aichi, Japan

ferruginea，*Thiobacillus ferrooxidans*，*Sphaerotilus natans*，*Leptothrix* sp. が報告されている（渡辺ほか，1965；加村ほか，1986；坂崎ほか，2002）．鉄酸化細菌とは水中に溶存するII価の溶存態鉄（第一鉄）を酸化しIII価の懸濁態鉄（第二鉄）として菌体内外に蓄積する能力をもった一群の細菌の総称である．また，一部の鉄酸化細菌は溶存するマンガン(II)を酸化する能力を有するものもいる（Boogerd and Vrind, 1987）．

鉄酸化細菌は，炭素源として二酸化炭素を利用し同時に鉄を酸化してエネルギーを獲得する独立栄養細菌（*G. ferruginea*，*T. ferrooxidans* 等）と，炭素源として有機物を利用すると同時に鉄を酸化する従属栄養細菌（*S. natans*，*Leptothrix* sp.，*Crenothrix* sp.，*Clonothrix* sp. 等）に生理学的に二分される（Ghiorse, 1984）．

尾瀬ヶ原は泥炭質で有機物を多く含んでいることから，本研究は従属栄養性鉄酸化細菌をアカシボ雪やアカシボ残存物から分離，培養し，アカシボ現象を微生物の面から解明することを目的とした．

2．観測と方法

2.1　観測日と地点

群馬県尾瀬ヶ原の冷凍のアカシボ雪（1999 年 5 月 8 日採取）とアカシボ残存物（10 月 30 日採取；5 月の最盛期にアカシボ生成されていた部分の泥①，②），及び 2000 年 5 月 27 日に山の鼻植物研究見本園（以下見本園）の各地点，St. 1，St. 2，St. 3，St. 4（図 1），見本園から約 1.5 km 北東にある牛首池塘（U 1）のアカシボ雪を採取した尾瀬アカシボ研究グループにより提供を受けてそれらを試料とした．

2.2　方法

2.2.1　アカシボ雪の有機物量の測定

アカシボ雪を溶解後乾燥し，強熱減量（IL）にて定量した．

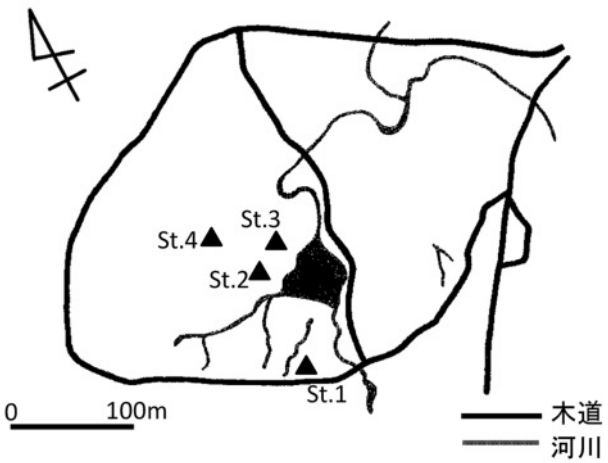

図 1：尾瀬ヶ原　山の鼻植物研究見本園

2.2.2　アカシボ雪・残存物の培養

2.2.2.1　培養方法

Rouf and Stokes (1964) の培養法に準じて調整した液体培地（表 1）を用いた．培地に各試料を 100 μl l^{-1} となるよう添加し培養した．培養温度 20°C及び 4°Cについては A 培地を使用した．0°C培養については A 培地では鉄酸化細菌の培養が顕著に認められなかったので，栄養を少なくし，鉄の量を多くした B 培地や C 培地を用いた．また，自然水の中性 pH では化学的鉄酸化が迅速なため（Widdel et al., 1993），pH 5.4〜5.8 において，Blank 実験を同時に行った．

2.2.2.2　培養温度

1999 年 5 月と 10 月の試料については，一般に水圏細菌は 20°C付近において菌の増殖が活発であること，また，アカシボは融雪時に出現することから 20°Cおよび 4°Cで培養した．

2000 年 5 月の試料は，雪の表面を覆っているアカシボは氷雪中の 0°C付近（地表温度 0.4°C；福原ほか，2006）で増殖可能な酸化能力を持つものと考えられたので，0°Cで培養した．

2.2.2.3　培養液中の鉄・マンガン測定

溶存態鉄（DFe）・溶存態マンガン（DMn）は，培養液 5 ml を GF/F (Whatman 25 mm) でろ過したろ液に C-HCl を 1〜2 滴加え，原子吸光分析法にて測定した．懸濁態鉄（PFe）・懸濁態マンガン（PMn）は，ろ過した際に用いたろ紙上の沈殿物をろ紙ごとバイアル瓶に入れ蒸留水 5 ml を加え更に C-HCl を 1〜2 滴加えた後，オートクレイブ（121°C，1 時間）により加熱分解後，原子吸光分析法にて測定した．

2.2.2.4　培養液中の細菌の増殖率

細菌の増殖率変化を調べるため吸光度（O. D.；660 nm）を測定し，同時に溶存態有機炭素（DOC）消費量も測定した．

2.2.3　分離菌の培養

2.2.3.1　分離方法

1999 年 5 月のアカシボ雪を 20°Cで固体培地（A 培地；表 1）により分離した鉄酸化細菌（4 種類；A 1，A 2，A 3，A 4 とする）について，液体 A 培地を用いて 20°C，4°Cにて実験を行った．この時，菌の増殖率変

表 1：培地（Rouf and Stokes, 1964）（蒸留水 100 mL）
液体培地は Agar を含まない

	A 培地	B 培地	C 培地
	2 gCl^{-1}	0.2 gCl^{-1}	0.2 gCl^{-1}
Pepton	0.5 g	0.05 g	0.05 g
Agar	1.2 g	1.2 g	—
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	5 mg	5 mg	5 mg
$CaCl_2$	5 mg	5 mg	5 mg
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	2 mg	10 mg	4 mg
Mn $(CH_3COO)_2$	1.8 mg	1.8 mg	1.8 mg

化は吸光度（O. D.；660 nm）のほか平面培地によってコロニー数（CFU）を計測して求めた．

更に，2000 年 5 月の St. 1，St. 2，牛首池塘地点（U1）の試水を 0°Cで固体培地（B 培地；表 1）により得られた分離菌（純粋分離せず混合培養）について液体 C 培地で培養を行い，菌の増殖に対応した鉄酸化の経日変化を調べた．

2.2.3.2　分離した鉄細菌の生理的特徴

1999 年 5 月に分離した鉄酸化細菌の特徴を，グラム染色，カタラーゼ反応，オキシターゼ反応等によって調べた．

2.2.4　位相差顕微鏡

2000 年 5 月の各地点の試料について位相差顕微鏡（OLYMPUS PM-20）写真を撮影した．

3．結果と考察

3.1　アカシボ雪の有機物量

1999 年 5 月と 2000 年 5 月のアカシボの I. L. はそれぞれ 67.2%，79.8%と有機物の割合が高かった．尾瀬ヶ原の表層は泥炭地であり（阪口，1989），豊富な有機物を含んでいる．一般に微生物が植物を分解する中で生成した種々雑多な有機化合物よりなる高分子化合物をフミン質あるいは腐食物質と称されたり，フミン酸，フルボ酸に大別されたりしている（日本水道協会，2001；石渡ほか，2008）．水中では，フミン質が存在すると鉄とフミン物質は錯化能力が強く，この錯体は沈殿せずに溶存状態を保つ．また，錯体の形成は金属の溶解度を飛躍的に増大させる．例えば，水中に天然由来のフミン物質が存在する場合，鉄を 109 倍溶け易くする（日本水道協会，2001；日本分析化学会北海道支部，1981）．尾瀬ヶ原において，錯体形成や嫌気環境によって溶存態の鉄が多く含まれていると推測される．

3.2　顕微鏡写真

2000 年 5 月の各地点の試料について位相差顕微鏡を用いて検鏡した．St. 1 付近のアカシボ雪や牛首地点から *Gallionera* sp. や *Leptothrix* sp. の鉄酸化細菌が確認できた（図 2）．

3.3　アカシボ試水の温度条件の異なる培養実験（1999 年 5 月アカシボ雪，10 月アカシボ残存物①，②）

1999 年 5 月アカシボ本体，10 月アカシボ残存物①，②のそれぞれの試水を 20°C，4°C下にて液体 A 培地を用いて 21 日間培養し，DFe・DMn，PFe・PMn，細菌数について経日変化を求めた（図 3，4）

20°C培養では，いずれの試料も 5 日目から細菌による PFe 生成が認められた．PMn も 8 日目以降から生成した．また DOC は 5 日目以降から急激な減少があり，同時に細菌増殖（吸光度；O. D.）の値は高くなった．この現象について Yagi (1986, 1996)，Yagi et al. (1991) 及び八木（1997）が報告しているように従属栄養細菌によって DOC が消費され，その際に DFe が PFe へと微生物過程に伴う変化があったと考えられた．

4°C培養では，いずれの試水も 20°C培養の結果よりややゆっくりではあるが培養 8 日目以降，鉄・マンガン酸化が認められた．同時に DOC 消費と細菌増殖（O. D.）の増加も認められた．このことから 4°C以下の低温においてもアカシボ雪や残存物中の細菌が鉄・マンガンを酸化し，増殖したことが確認できた．

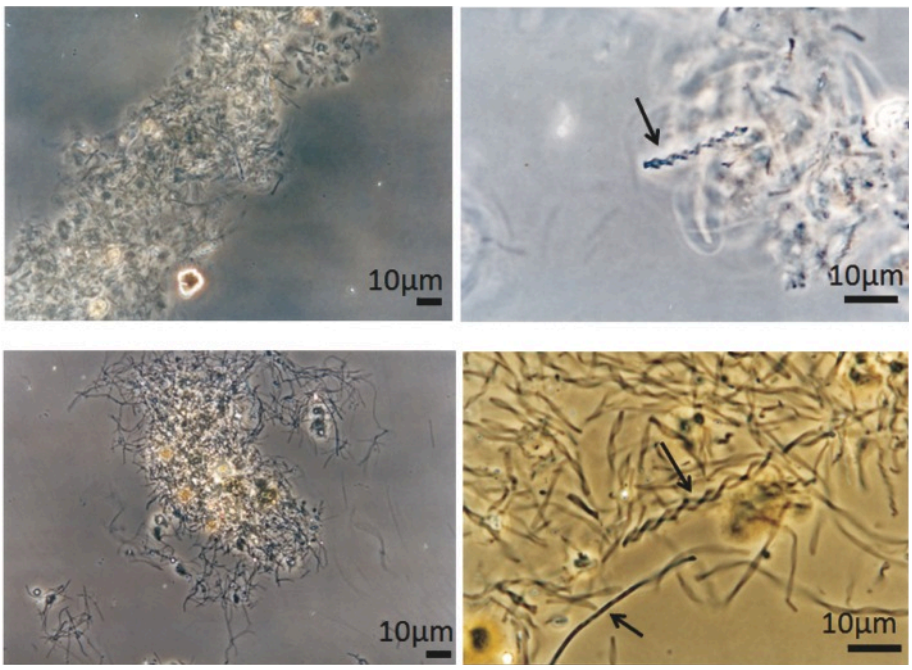

図 2：上図；牛首池塘アカシボ試料の顕微鏡写真　矢印；*Gallionera* sp.
下図；St. 1 付近アカシボ本体の顕微鏡写真
上矢印；*Gallionera* sp.，下矢印；*Leptothrix* sp.

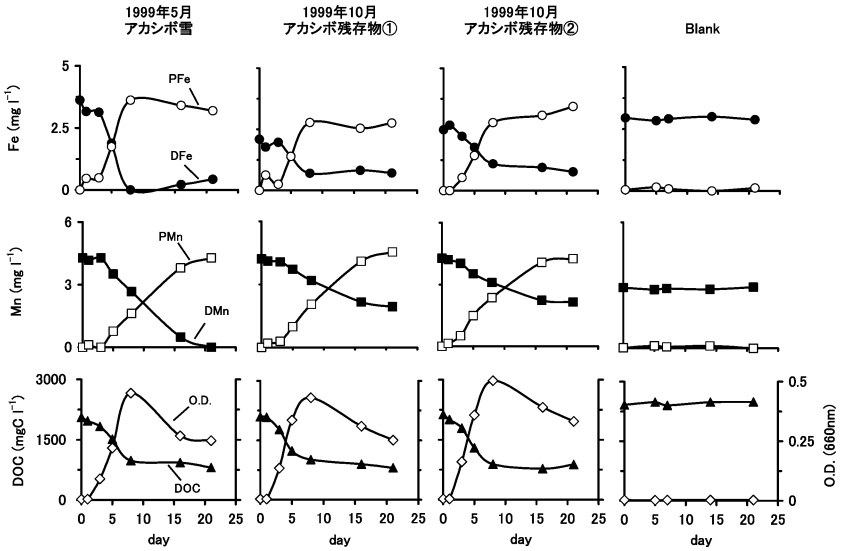

図3：1999年5月，10月試料の20°C培養における溶存態鉄（DFe）・マンガン（DMn），懸濁態鉄（TFe）・マンガン（TMn），溶解性有機物（DOC）及び従属栄養細菌（O. D.）の経日変化を示す

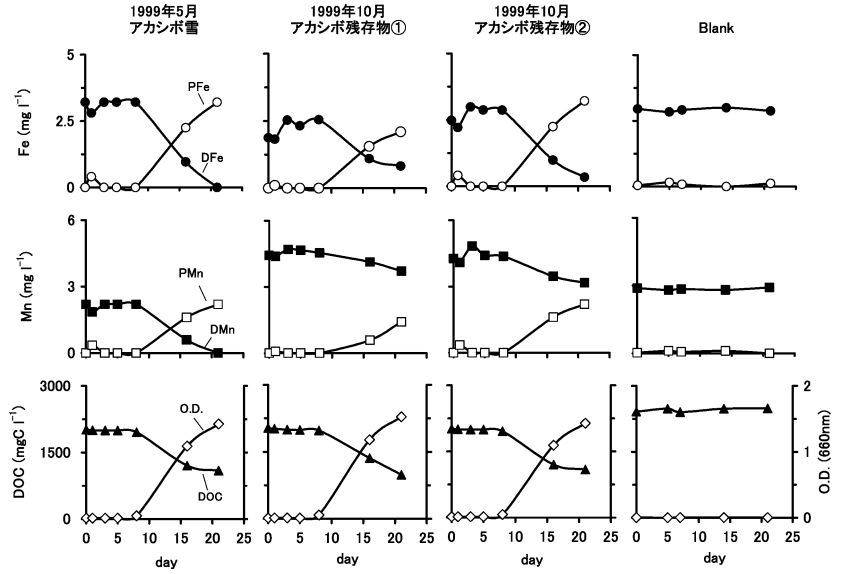

図4：1999年5月，10月試料の4°C培養における溶存態鉄（DFe）・マンガン（DMn），懸濁態鉄（TFe）・マンガン（TMn），溶解性有機物（DOC）及び従属栄養細菌（O. D.）の経日変化を示す

3.4　分離菌の温度条件の異なる培養実験（1999年5月試水を20℃で培養し分離した鉄酸化細菌A1，A2，A3，A4）

1999年5月試水を20°C固体A培地で分離した細菌の生理試験結果（表2）や液体A培地で20°C14日間培養した外観（図5）からA1〜A4の細菌は種類の異なるものと考えられた．

分離した細菌A1〜A4及びBlankについて，液体A培地を用いて20°Cで14日間，4°Cで38日間それぞれ培養し，吸光度のほかコロニー数（CFU）を数え，菌の増殖を求めた．それらの結果を図6，7に示す．

分離菌A4は20°C，4°C培養ともにDFe・DMn減少，PFe・PMn増加，DOC減少，細菌数増加がみられた．4°C培養は20°C培養と比べPFe・PMn生成速度は

表2：1999年5月試水を20°CA培地にて分離したA1〜A4細菌の生理試験の結果

	A1	A2	A3	A4
Gram staining	＋	＋	−	＋
Catalase	＋	＋	−	＋
Oxidase	−	−	＋	−
O/F	0	0	0	(0)
Starch	−	−	−	−
Casein	−	＋	−	＋
Gelatin	−	−	−	−
DNA	−	−	−	−
Na 0.62%	＋	＋	＋	＋
Na 1.25%	−	＋	−	＋
Na 2.5%	−	＋	−	＋
Na 5.0%	−	＋	−	＋
Na 10.0%	−	−	−	＋

遅いが，低温でも十分に鉄・マンガンを酸化し増殖する細菌であることが示唆された．

分離菌Ａ1は鉄酸化が20℃培養では顕著であったが4℃培養ではほとんどみられなかった．また，マンガンについても20℃では若干酸化がみられたが，4℃では酸化がみられなかった．4℃の低温下では鉄の酸化能力が低下する細菌であった．

図5：1999年5月試料を20℃培養にて分離したＡ1～Ａ4細菌の20℃における液体培地の写真

分離菌Ａ2，Ａ3は鉄・マンガンの変動が小さく，20℃培養でも鉄・マンガン酸化能力が低い細菌であると考えられた．

渡辺ほか（1965）は，鉱山の坑内水中の鉄酸化細菌は20～30℃が最適増殖温度であり15℃ないし7℃になると増殖が著しく抑えられるとしているが，今回，アカシボ雪から分離した細菌の中には，分離菌Ａ4のように低温でも活発に鉄を酸化し増殖する細菌の存在が確認できた．

3.5　2000年5月試水を用いた温度条件0℃での培養実験

St. 1～4試水とBlankを0℃，液体Ｂ培地で培養し48日間の経日変化を求めた（図8）．いずれの試水もPFe生成とともにDOCの消費に対応し，O. D. の増加が明瞭に認められた．このことから鉄酸化細菌によって酸化鉄の生成があったことは明らかである．

PMnは今回の培地を用いた0℃培養，48日間ではど

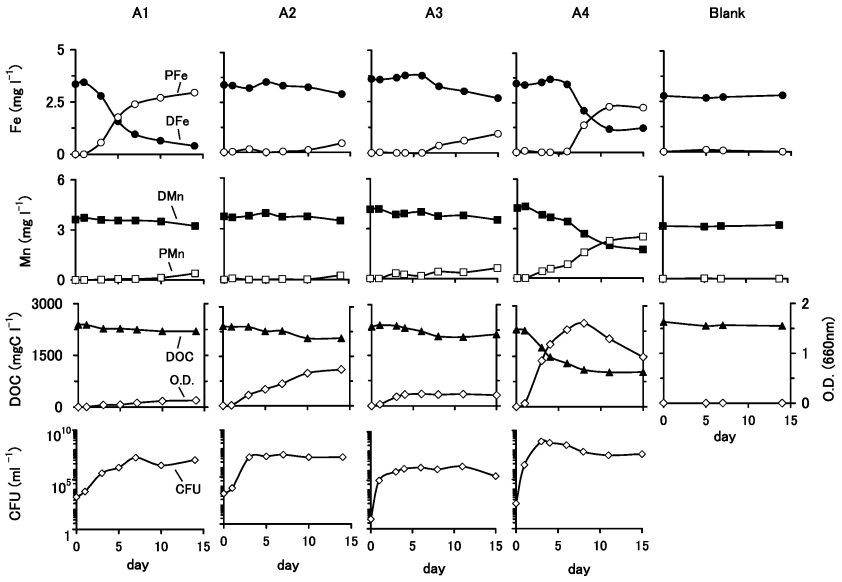

図6：1999年5月試料を20℃培養にて分離したＡ1～Ａ4細菌の20℃における溶存態鉄（DFe）・マンガン（DMn），懸濁態鉄（TFe）・マンガン（TMn），溶解性有機物（DOC）及び従属栄養細菌（O. D., CFU）の経日変化を示す

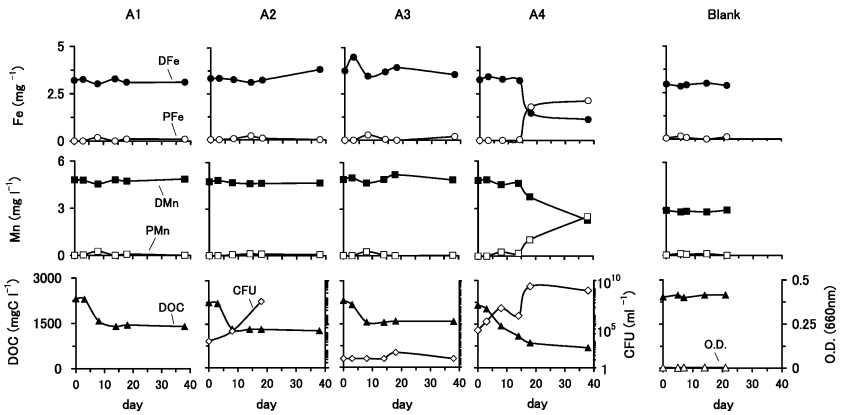

図7：1999年5月試料を20℃培養にて分離したＡ1～Ａ4細菌の4℃における溶存態鉄（DFe）・マンガン（DMn），懸濁態鉄（TFe）・マンガン（TMn），溶解性有機物（DOC）及び従属栄養細菌（O. D., CFU）の経日変化を示す

の試水においても，生成が認められずマンガン酸化を確認することができなかった．

3.6　2000年5月試水の0℃での分離菌の0℃培養実験

2000年5月の各地点（St. 1〜4，U 1）の試水を固体B培地で0℃において培養した結果，St. 1，St. 2，牛首池塘（U 1）の試水から細菌が培養できた．これら3地点の細菌群をそれぞれS 1，S 2，U 1とした．そして液体C培地を用いて0℃下37日間培養し経日変化を求めた（図9）．なおここでの細菌は純粋培養ではなく混合培養とした．

S 1は培養8日目以降顕著な鉄酸化が見られた．同時にDOCもゆっくりではあるが消費されO. D.によって鉄酸化細菌の増殖も確認できた．S 2においては培養12日目以降に顕著な鉄酸化がみられ，DOC消費，O. D.による菌の増加はゆっくりではあるが培養22日目以降にみることができた．U 1は培養8日目以降O. D.による菌の増殖が顕著にみられ，22日目以降にPFe生成が少量あった．B及びC培地で適応した分離菌の混合培養によって，0℃においても鉄を活発に酸化し増殖する細菌の存在が確認できた．

4．まとめ

①アカシボ雪に有機物が多く存在した．尾瀬ヶ原は泥炭質であることから，有機物分解により嫌気環境になりやすく鉄は二価鉄（Fe^{2+}）として存在したり，難分解性のフミン質などと錯体を形成し溶存態鉄として存在したりしていると考えられる．

②顕微鏡でアカシボ雪の中に代表的な鉄酸化細菌である *Gallionera* sp. や *Leptothrix* sp. が観察され，鉄酸化細菌の存在を確認できた．

③試水中の細菌や分離菌の培養実験において，低温（0℃，4℃）環境下でも鉄の酸化と細菌の増殖が可能であることがわかった．マンガン酸化は低温環境下ではほとんど認められなかった．今回用いた培地では，低温環境下でのマンガン酸化を確認することはできなかった．

④融雪時には水量が増えるため地下水や融雪水が積雪中に押し上げられる．低温環境下においても活発に鉄を

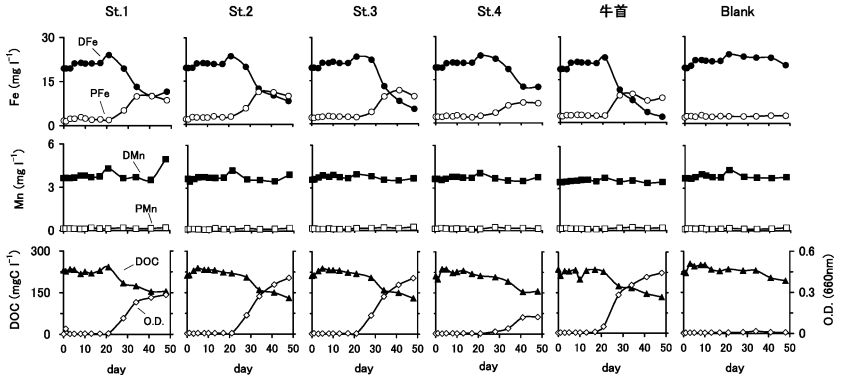

図8：2000年5月地点St. 1〜4，牛首の試料の0℃培養における溶存態鉄（DFe）・マンガン（DMn），懸濁態鉄（TFe）・マンガン（TMn），溶解性有機物（DOC）及び従属栄養細菌（O. D.）の経日変化を示す

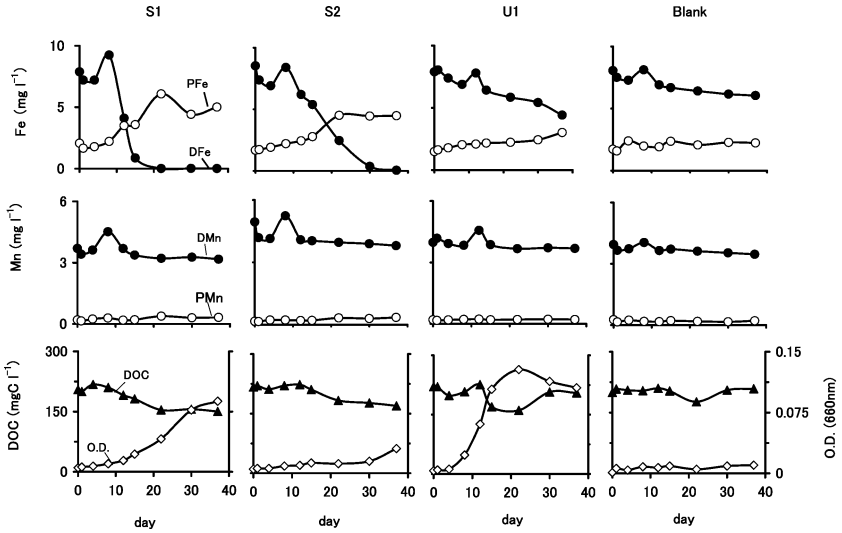

図9：2000年5月地点St. 1，St. 2，牛首の試料を0℃培養し分離したS 1，S 2，U 1細菌の0℃における溶存態鉄（DFe）・マンガン（DMn），懸濁態鉄（TFe）・マンガン（TMn），溶解性有機物（DOC）及び従属栄養細菌（O. D.）の経日変化を示す

酸化することができる鉄酸化細菌が，地下水中に溶け込んでいる鉄や有機物を栄養源とし，雪中の酸素を使って増殖する．鉄酸化細菌によって酸化鉄が増加し雪を赤褐色に呈色することがアカシボ現象の一つの要因と考えられた．

謝辞

本研究の試料は尾瀬アカシボ研究グループから提供を受けた．記して感謝申し上げる．

引用文献

Boogerd, F. C., J. P. M. De Vrind (1987) Manganese oxidation by *Leptothrix discophora*. *J. Bacteriol.*, 169, 489–494.

Fukuhara, H., Ohtaka, A., Kimura, N., Fukui, M., Kikuchi, Y., Nohara, S., Ochiai, M., Yamamoto, Y., Oze Akashibo Research Group (2002) Spring red snow phenomenon 'Akashibo' in the Ozegahara mire, Central Japan, with special reference to the distribution of invertebrates in red snow. *Verh. Internat. Verein. Limnol.*, **28**, 1645–1652.

福原晴夫，大高明史，木村直哉，菊池義昭，山本鎔子，落合正広，福井学，野原精一，尾瀬アカシボ研究グループ（2006）尾瀬ヶ原のアカシボ現象に関する研究 ── 尾瀬ヶ原のアカシボにみられる無脊椎動物 ──．陸水学雑誌，**67**，81–93．

Ghiorse, W. C. (1984) Biology of iron-and manganese-depositioning bacteria. *Ann. Rev. Microbiol.*, **38**, 515–550.

石渡良志，米林甲陽，宮島徹（2008）環境中の腐食物質 ── その特徴と研究法：4–7，三井出版，東京．

加村崇雄，大源正明（1986）希釈頻度法による鉄細菌の計数．日本土壌肥料学雑誌，**57**，248–251．

小林義雄，福島博（1952）日本に於ける赤雪と緑雪に就いてⅠ．植物学雑誌，**65**，77–85．

日本分析化学会北海道支部（1981）水の分析（第 3 版）：371–374，化学同人，京都．

日本水道協会（2001）上水試験方法　解説編　2001 年版：172–174，日本水道協会，東京．

大高明史，山崎千恵子，野原精一，尾瀬アカシボ研究グループ（2008）青森県のアカシボ発生地域における雪中の無脊椎動物．陸水学雑誌，**69**，107–119．

Rouf, M. A., J. L. Stokes (1964) Morphology, nutrition and physiology of *Spaerotilus discophorus*. *Arch. Microbiol.*, **49**, 132–149.

阪口豊（1989）尾瀬ヶ原の自然史．中央公論社，東京．

坂崎京子，八木明彦，横井時秀，寺井久慈（2002）井戸水中の従属栄養性鉄酸化菌による懸濁態鉄の生成と溶存有機炭素の消費．陸水学雑誌，**63**，45–57．

Yagi, A. (1986) Dissolved organic carbon and manganese in the boundary of the oxic and anoxic layers in lake Fukami-ike and Suigetsu-ko. *Jan. J. Limnol.*, 47, 291–298.

Yagi, A., Miyachi, S., Terai, H. (1991) Vertical distribution of purpul nonsulphur bacteria and their utilization of dissolved organic carbon in Lake Fukami-ike. *Arch. Hydrobiologie.*, **121**, 307–317.

Yagi, A. (1996) Manganese flux associated with dissolved and suspended manganese forms in lake Fukami-ike. *Wat. Res.*, 30, 1823–1832.

八木明彦（1997）湖沼の酸化還元境界層としての化学躍層におけるマンガンの特徴．水処理技術，**38**，171–183．

山本鎔子，大高明史，林卓志，福原晴夫，野原精一，落合正広，尾瀬アカシボ研究グループ（2004）東北地方の赤雪．陸水学雑誌，**65**，181–191．

山本鎔子，林卓志，落合正広，福原晴夫，大高明史，野原精一，福井学，菊池義昭，尾瀬アカシボ研究グループ（2006）尾瀬ヶ原のアカシボ現象に関する研究 ── 赤雪の垂直分布と藻類との関わり ──．陸水学雑誌，**67**，209–217．

渡辺圧美，内田武司，古谷進（1965）金属鉱山坑内水中の鉄，硫黄酸化バクテリアの同定および鉄酸化バクテリアの特性について（第 1 報）．陸水学雑誌，**26**，152–164．

Widdle, F., S. Schnell, S. Heising, A. Ehrenreich, B. Assnus, B. Schink (1993) Ferrous iron oxidation by anoxgenic phototrophic bacteria. *Nature*, **362**, 834–836.