



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	結晶性酸化鉄を還元する土壌微生物群の同定と集積培養
Author(s)	堀, 知行
Citation	低温科学, 70, 153-158
Issue Date	2012-03-31
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/49065
Type	departmental bulletin paper
File Information	LTS70_021.pdf



結晶性酸化鉄を還元する土壤微生物群の 同定と集積培養

堀 知行¹⁾

2012 年 1 月 12 日受付, 2012 年 1 月 18 日受理

鉄は地球上第四位の構成元素であり、二価または三価の鉄鉱物として陸上土壤圏だけでなく海底地下圏にも広く分布している。そのため、鉄の酸化還元に関与する微生物群は、地球の炭素・エネルギーフラックスに重要な役割を果たしていると考えられる。本稿では、「結晶性酸化鉄を還元する土壤微生物群」に関する我々の研究を紹介する。まず初めに、当該微生物群の発見に至った農耕地土壤（水田）における生物学的な鉄還元反応を簡単に概説する。続いて、分子生態学的手法 Stable Isotope Probing を用い、嫌気水田土壤で代謝活性を有する「結晶性酸化鉄の還元微生物群」を同定した実験について解説する。さらに、様々な土壤試料を微生物接種源として用い、結晶性酸化鉄を還元する微生物集積系を獲得した最近の試みを報告し、最後に本書の主題である「アカシボ現象」の発生・発達に対する鉄還元微生物群の関与について考察したい。

Identification and enrichment culture of soil microorganisms involved in the crystalline iron(III) reduction

Tomoyuki Hori¹

Iron is the fourth most abundant element on earth and is distributed as forms of the ferrous and/or ferric iron minerals not only on the earth's surface but also in the deep seafloor. Thus, the microbes involved in the iron redox dynamics would play important roles in the carbon and energy fluxes on earth. In this article, we have reported our recent research activities with respect to soil microbes responsible for the reduction of crystalline iron(III) oxides. Prior to the experimental parts, we have briefly outlined the microbiological iron reduction processes in the agricultural paddy soils. At first, we have identified active, acetate-oxidizing, and iron(III)-reducing bacteria, including hitherto unrecognized populations, in anoxic rice field soils using RNA-stable isotope probing. Secondly, we have obtained enrichment cultures of soil microbes that are able to reduce highly crystalline ferric iron minerals (e.g., hematite, magnetite, goethite, lepidocrocite) coupled with anaerobic acetate oxidation. Finally, we have discussed the involvement of the novel iron(III)-reducing bacteria in the formation and development of reddish-brown iron-rich snow (referred by locals as "Akashibo") in Japanese alpine mires.

1. はじめに

鉄は地球上第四位の構成元素であり、その多くは鉄鉱物として陸上土壤圏や海底地下圏などに広く存在している (Weber et al., 2006a)。鉄は、鉱物などの配位化合物を形成する際、主に二価または三価の陽イオンの形態をとっているが、両者の安定性の差は極めて小さい (矢

田, 2005)。この事は、鉄原子自体が電子を他から受け取りやすくかつ他へ渡しやすいという特筆すべき鉄の性質を生み出している。鉄化合物は、生物学的および化学的に酸化還元を受ける事により、自然環境中で二価と三価の状態を行き来し、それによって地球上の炭素・エネルギー循環に関与している。本書で特集する雪表面の彩色現象「アカシボ現象」も、自然環境における鉄の酸化還元ダイナミクスのひとつとして捉えられる。これまでの研究から、アカシボの本体は結晶性酸化鉄を外部にまとった緑藻 (*Hemitona* sp.) の休眠胞子として形態学的に特徴づけられること、さらにアカシボ現象が著しく観察される雪中部位では鉄還元微生物である *Geobacter* spp. が優占化していることが明らかにされている (Fu-

1) 独立行政法人産業技術総合研究所 環境管理技術研究部門

¹ Research Institute for Environmental Management Technology, National Institute of Advanced and Industrial Science and Technology, Tsukuba, Japan
E-mail: hori-tomo@aist.go.jp

kuhara et al., 2002; Kojima et al., 2009; Yamamoto et al., 2006). これらの研究成果は、アカシボ現象が「鉄」と「微生物」の何らかの関わり合いにより引き起こされていることを強く示唆するものである。

本稿では、これまでの研究からそのアカシボ現象への関与が予想される「結晶性酸化鉄を還元する土壤微生物群」に焦点を当てる。まず初めに、当該微生物群の発見に至った農耕地土壌（水田）における生物学的な鉄還元反応を概説する。その後、未培養微生物の種類と機能を結びつける分子生態学的手法「Stable Isotope Probing (SIP)」を用い、嫌気水田土壌で代謝活性を有する結晶性酸化鉄の還元微生物を同定した我々の研究を紹介する。さらに様々な土壌試料を微生物接種源として用い、結晶性酸化鉄を還元する微生物集積系を獲得した最近の試みを報告し、最後にアカシボ現象における鉄還元微生物群の寄与について考察したい。

2. 農耕地土壌（水田）における鉄還元微生物群について

水田土壌において鉄還元反応はメタン生成反応に次ぐ第二の最終電子受容プロセスである (Yao et al., 1999)。水田土壌の微生物学研究により、鉄還元活性は湛水後すぐの水田土壌、酸素が供給され鉄(II)の酸化（鉄[III]の生成）が起こるイネ根圏域や水・土壌の境界域などで主に観察されてきた (Frenzel et al., 1999; Liesack et al., 2000; Lueders and Friedrich, 2000)。また水田土壌における鉄還元微生物の菌数は乾燥土壌 1 g 当たり 10^7 cells で、これは可溶化・発酵性細菌の菌数である 10^{10} cells g^{-1} に比べると極めて小さいが、それでもなおメタン生成菌の 10^6 cells g^{-1} よりも 1 オーダー大きい値として報告されている (Frenzel et al., 1999)。さらに培養に依存しない分子生態学的解析法によっても、鉄還元微生物は稀少種として特徴づけられている (Hengstmann et al., 1999; Liesack et al., 2000; Noll et al., 2005)。では、どのような微生物が水田土壌における鉄還元反応に関与しているだろうか。これまでに分離培養法や微生物群集構造解析法などによっていくつかの鉄還元細菌群が水田土壌から検出されてきたものの (Hengstmann et al., 1999; Scheid et al., 2004; Treude et al., 2003)、土壌における鉄還元活性と微生物の系統を直接結びつけた研究報告はなかった。これは、鉄還元に関わる微生物が系統学的に非常に多様であり (Lovley, 1991; Weber et al., 2006b)、それにより鉄還元微生物群を特異的に検出する生物化学的指標やマーカー機能遺伝子が得られていないことに少なからず起因している。この技術的困難をブレイクスルーしたのが、未培養微生物の「系統」と「代謝機能」を結びつける分子生態学的手法 SIP である (Dumont and Murrell, 2005; Radajewski et al., 2000;

Radajewski et al., 2003)。本手法の原理は、ある系（環境試料など）に ^{13}C などを含む安定同位体基質を加えて一定期間培養した後、そこから同位体を取り込んで重くなった微生物核酸を密度勾配遠心で分離して塩基配列を決定し、加えた基質を資化した微生物の同定を行うというものである。我々は、SIP 法を独自に改良し ^{13}C 同化代謝と鉄還元反応（エネルギー代謝）とを関連づけて評価することによって、未知のベールに包まれていた嫌気水田土壌の鉄還元細菌群の同定に成功した (Hori et al., 2010)。次項でこの研究の詳細について述べる。

3. SIP 法による結晶性酸化鉄を還元する土壤微生物群の同定 (Hori et al., 2010)

これまでに水田土壌微生物群の鉄還元活性を測定した研究では、土壌にもともと存在する酸化鉄とその還元によって生じる二価の鉄の物質収支が完全にとれることはなく、高結晶性を有する酸化鉄の多くはその生物難利用性がゆえに還元されずに嫌気土壌に存在していると考えられてきた (Liesack et al., 2000)。事実、土壌環境で最も豊富に存在する結晶性酸化鉄のひとつである Goethite (Cornell and Schwertmann, 1996) は、生物学的な還元をほぼ受けないと報告されている (Komlos et al., 2007; Lovley and Phillips, 1986; Lovley and Phillips, 1987; Lovley and Phillips, 1988)。しかし我々の先行研究により、水田土壌で鉄還元菌に近縁な未培養微生物群が嫌氣的に酢酸を取り込むことが明らかされたことから、嫌気土壌における「結晶性酸化鉄の還元」の重要性が問い直されることになった (Hori et al., 2007)。ここでは、嫌気土壌の主要な鉄鉱物である高結晶性の Goethite と水田の酸化・還元層の境界でよく観察される結晶性の弱い酸化鉄 Ferrihydrite を電子受容体基質として採用した。鉄還元菌の純粋培養試験により、Ferrihydrite は Goethite よりも速く還元されることが示されていたが (Roden, 2006; Roden and Wetzel, 2003)、水田土壌において酸化鉄の還元に関与している微生物種は明らかになっていない。そこで本研究では、嫌気水田土壌において Ferrihydrite と Goethite の存在に依存して酢酸を同化する微生物群、すなわちそれら結晶性酸化鉄の還元と酢酸酸化を共役させてエネルギーを得る鉄還元微生物群を SIP 法により同定することを試みた。長期間の前培養により CO_2 以外の無機電子受容体をほぼ枯渇させた水田土壌を用意し、そこに ^{13}C -酢酸とその酸化に十分量の結晶性酸化鉄 (Ferrihydrite または Goethite) を添加した後、72 時間の嫌気培養を行った。Ferrihydrite 添加系では、化学量論に見合った酢酸酸化と鉄還元が観察され (図 1A)、鉄を添加しない対照系と比べメタン生成量が 77% 減少した。一方、Goethite 添加系では、既存の方法では鉄還元活性が検出できな

かったものの、対照系に比べ、メタン生成量が僅かながら（9%）減少し酢酸の分解速度も勝っていた（図1B, C）。培養後の土壌からRNAを抽出し、超遠心によって密度ごとに分離した後、RNAの各密度画分をRT-PCRを介したT-RFLPおよびクローンライブラリにより解析した。その結果、Ferrihydrite添加系の高密度RNA画分では*Geobacter*属細菌群が主要構成種となり、一方でGoethite添加系の高密度RNA画分では*Geobacter*属に加えて*Anaeromyxobacter*属とBeta-proteobacteria綱に属する未培養細菌群が優占化した。これらの細菌群は、鉄還元菌として同定されているものの、既存の分離株とは異なり系統樹上で独自の新しい分岐群を形成した。さらに興味深いことに、添加した結晶性酸化鉄の種類によって代謝活性化される鉄還元微生物群が異なっていたことから、土壌に生息する鉄還元菌群が結晶性酸化鉄（電子受容体基質）の利用性の違いによ

って棲み分けを行っていることが強く示唆された（図2：本実験で ^{13}C 酢酸を取り込んだ*Geobacter*属細菌群の系統樹）。これらの新しい鉄還元微生物群がどのような代謝戦略により結晶性酸化鉄に電子を受け渡しているのか今のところ分かっていないが、酸化鉄への接触による直接還元（Childers et al., 2002; Weber et al., 2006a）、微生物ナノワイヤーを用いた電子伝達（Reguera et al., 2005）、電子シャトル分子（腐植酸やFe(III)キレート物質、硫黄化合物）を介した間接還元（Lovley et al., 1999; Nevin and Lovley, 2002a; Nevin and Lovley, 2002b）などの様々な機構が考えられる。本研究により、嫌気土壌圏においてこれまで知られていなかった鉄還元微生物群が結晶性酸化鉄を着実に還元し生育しているという驚くべき事象が明らかになった。

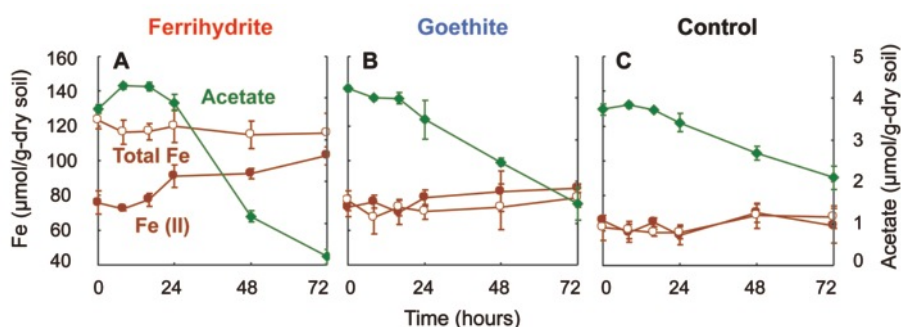


図1：結晶性酸化鉄（Ferrihydrite または Goethite）と ^{13}C -酢酸による水田土壌の培養過程。全鉄濃度を○、二価鉄濃度を●、酢酸濃度を◆で示す。エラーバーは、3 連実験で得られたデータの標準偏差を示す。

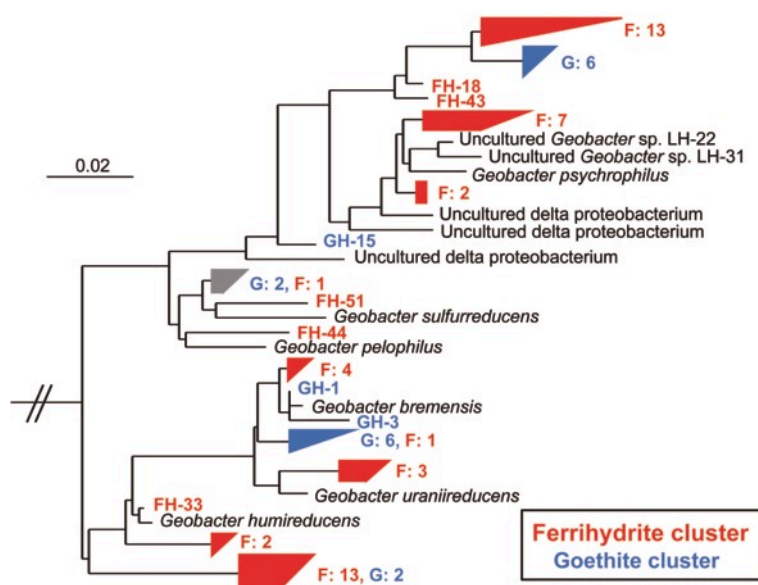


図2：高密度RNA画分で主要となった*Geobacter*属細菌群の系統樹。Ferrihydrite添加系またはGoethite添加系から得られたクローンをそれぞれ「F」の頭文字（赤色、太字）, 「G」の頭文字（青色、太字）で示す。クラスターの横に表記される数字は含まれるクローンの個数（F: Ferrihydrite系から得られた個数, G: Goethite系から得られた個数）。結晶性酸化鉄の種類によって異なる鉄還元細菌群が代謝活性化されている様子が伺える。

4. 結晶性酸化鉄を還元する微生物集積系の獲得

鉄還元微生物は、土壌や地下水、温泉、海底熱水噴出孔など様々な自然環境からクエン酸酸化鉄や Ferrihydrite などを電子受容体基質とした嫌気培養により取得されてきた (Lovley et al., 2004). 既存の鉄還元活性測定法は可溶性または弱い結晶性を示す酸化鉄を標的としているため、Goethite などの高結晶性酸化鉄による微生物培養系において鉄還元活性を検出することは難しい (Lovley and Phillips, 1986; Lovley and Phillips, 1987; Lovley and Phillips, 1988). しかし SIP 法を駆使した我々の研究により、高結晶性を示す酸化鉄であっても長い時間をかければ土壌微生物群によって還元されることが示された (Hori et al., 2010). そこで本研究では、分子系統学的に存在は知られているもののその実体の明らかでない「結晶性酸化鉄を還元する土壌微生物群」の集積培養系の取得を試みた。従来の微生物培養では用いられてこなかった高結晶性を示す酸化鉄鉱物「Hematite, Goethite, Lepidocrocite, Magnetite」を電子受容体基質、酢酸を電子供与体基質とした嫌気培地により、様々な土壌環境試料（水田・森林・湿地土壌、用水路堆積物、海底地下コア）を微生物接種源として、約 150 の条件で集積培養を開始した。なお、酢酸がメタン生成反応に利用されることを防ぐために、メタン生成菌の生育阻害剤である 2-プロモエタンスルホン酸塩 (BES) の添加区も用意した。結晶性酸化鉄が還元を受けることで生じる培養系の色の変化を継代の指標にし、約 2 年間にわたる培養の末、4 種の酸化鉄それぞれに対して鉄還元反応が観察される 57 の微生物集積系を取得することができた。これらの構成微生物種を明らかにするために細菌とアーキアの 16S rRNA 遺伝子クローンライブラリを構築し、合計で約 500 クローンの塩基配列解読・系統解析を行ったところ、得られたクローンのほとんどが既知微生物に対して 90% 程度の低い配列相同性を示した。中でも鉄還元細菌として知られる *Geobacter* 属や *Anaeromyxobacter* 属、*Desulfovibrio* 属細菌群を多数検出した。さらにいくつかの集積培養系において、Chloroflexi 門や Firmicutes 門、Acidobacteria 門、Betaproteobacteria 綱などの広範な分類群に属する未培養細菌群の優占化が観察された。これらは、鉄還元や重金属還元などが活発な自然環境から取得されたクローンと配列相同性が高いことから (Burkhardt et al., 2010; Joynt et al., 2006; Winch et al., 2009), 鉄還元能を有する新規細菌群であることが強く示唆された。一方で、結晶性酸化鉄の微生物還元による変容に関して興味深い現象が確認された。具体的には、同じ結晶性酸化鉄を基質とした場合でも集積培養系の構成微生物種の違いによって鉄還元後の培養系の色や形状が異なることが明らかにされた（ここでは、図 3、図 4 に Lepido-

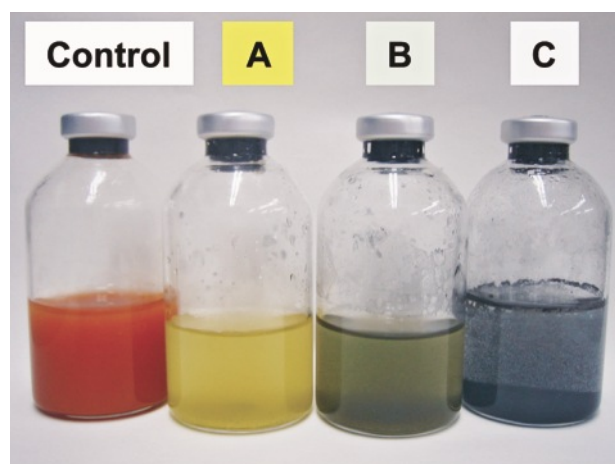


図3：結晶性酸化鉄「Lepidocrocite」による微生物集積系の写真。同一基質ながら異なる培養条件で得られた微生物集積系 A, B, C を示す（対照系は左に示す）。同じ酸化鉄を用いた場合でも条件の違いによって鉄還元後の培養系の色や形状が異なっているのが分かる。

crocite 培養系の例を示す）。培養系 B と C は構成微生物種が似ているため鉄還元速度の差による培養系の色・形状の違いと捉える事もできるが、培養系 A では構成種や培養系の色も他の 2 種の培養系とは大きく異なる。このような事象は、Goethite などの他の結晶性酸化鉄を用いた集積培養系でも同様に観察された。即ちこれらの実験結果は、同様の結晶性酸化鉄であっても還元に関与する微生物群が異なれば、反応生成物（二価鉄の結晶性化合物）の種類も変化することを示唆するものである。本研究によって、これまで考えられてきたよりも多様な微生物群が鉄還元に関与すること、さらにその反応メカニズムも多岐にわたる可能性が示された。

5. おわりに

本稿の前半部では、SIP 法を駆使し嫌気環境における炭素とエネルギーの連鎖を紐解くことで、農耕地土壌で代謝活性を有する「結晶性酸化鉄を還元する土壌微生物群」を発見した研究を紹介した。本書の主題である「アカシボ現象」が観察される雪中においても、結晶性酸化鉄の還元能を有する *Geobacter* spp. が主要な構成微生物種として検出されている (Kojima et al., 2009). これらの点を踏まえれば、アカシボ現象の発生・発達には土壌中の鉄還元微生物群が深く関与していると考えられる。また本稿の後半部では、酸化鉄の還元による変容（変色）がそれに関与する微生物群の種類によって大きく異なるという実験結果を示した。この事は、アカシボ現象が見られる様々な地域において雪表面の彩色が一様ではないこと（山本ほか, 2004; 山本ほか, 2006）の要因のひとつとして捉えられるかもしれない。しかし現在までのところ、アカシボ雪中では鉄還元微生物群の存在が確認されているのみで、その鉄還元反応メカニズム（例え

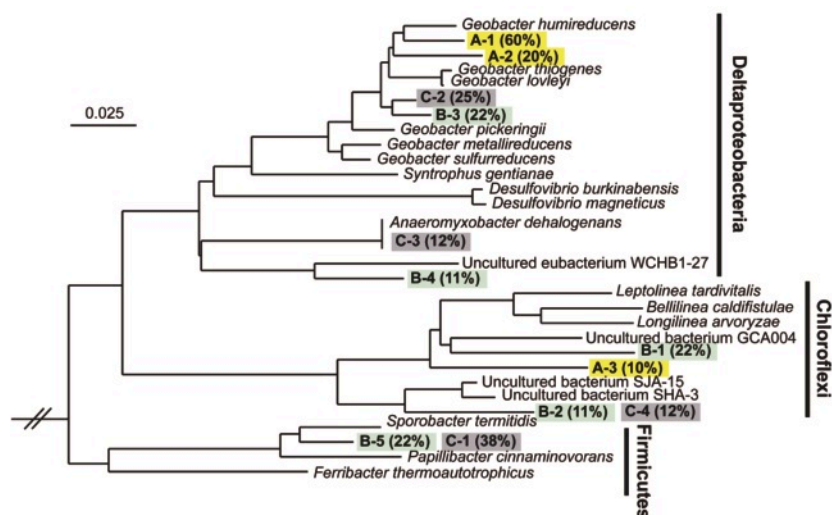


図4：結晶性酸化鉄「Lepidocrocite」を還元する微生物集積系A, B, Cの構成微生物種の系統樹。培養系A, B, Cから得られたクローンをそれぞれ「A」の頭文字（太字、背景黄色）, 「B」の頭文字（太字、背景緑色）, 「C」の頭文字（太字、背景灰色）で示す。括弧内の数値は、構築されたライブラリに占める当該クローンの割合を示す。培養系B, Cは構成種が類似しているが、培養系Aの構成種はそれらと全く異なっている。

ば、鉄還元反応を支える電子供与体が何であるか等）は明らかになっていない。アカシボ雪中には緑藻休眠胞子や無脊椎動物が高密度で存在することが報告されている（Fukuhara et al., 2002；福原ほか, 2006；Yamamoto et al., 2006）。これらの土壌生物細胞の分解によって生じる有機物も鉄還元と共役する酸化反応の基質として働いている可能性は高い。一方で、アカシボ現象の顕著な雪中部位では、鉄の酸化還元状態の劇的な遷移が予想されるが、鉄(III)から鉄(II)への変換は鉄還元細菌群が担うとしても、鉄(II)から鉄(III)への酸化が化学的に（大気中酸素等によって）もしくは生物学的に（鉄酸化細菌群によって）行われているのかについては全くの不明である。アカシボ現象の発生・発達機構や生態学的意義を根本的に理解するためには、アカシボ雪中の物質循環の根幹をなす「鉄の酸化還元ダイナミクス」の詳細を生物学的・化学的に明らかにしてゆくことが必要不可欠であろう。

引用文献

- Burkhardt, E. M., D. M. Akob, S. Bischoff, J. Sitte, J. E. Kostka, D. Banerjee, A. C. Scheinost, and K. Kusel. (2010) Impact of biostimulated redox processes on metal dynamics in an iron-rich creek soil of a former uranium mining area. *Environ Sci Technol.*, **44**, 177-183.
- Childers, S. E., S. Ciufo, and D. R. Lovley. (2002) *Geobacter metallireducens* accesses insoluble Fe(III) oxide by chemotaxis. *Nature*, **416**, 767-769.
- Cornell, R. M. and U. Schwertmann. (1996) *The Iron Oxides: Structure, Properties, Reactions, Occurrence and Uses*. VCH, New York, NY.
- Dumont, M. G. and J. C. Murrell. (2005) Stable isotope probing - linking microbial identity to function. *Nat Rev Microbiol.*, **3**, 499-504.
- Frenzel, P., U. Bosse, and P. H. Janssen. (1999) Rice roots and methanogenesis in a paddy soil: ferric iron as an alternative electron acceptor in the rooted soil. *Soil Biol Biochem.*, **31**, 421-430.
- Fukuhara, H., A. Ohtaka, N. Kimura, M. Fukui, Y. Kikuchi, S. Nohara, M. Ochiai, Y. Yamamoto, and O.a.r. 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, 落合正宏, 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——. 陸水学会誌, **67**, 81-93.
- Hengstmann, U., K. J. Chin, P. H. Janssen, and W. Liesack. (1999) Comparative phylogenetic assignment of environmental sequences of genes encoding 16S rRNA and numerically abundant culturable bacteria from an anoxic rice paddy soil. *Appl Environ Microbiol.*, **65**, 5050-5058.
- Hori, T., A. Muller, Y. Igarashi, R. Conrad, and M. W. Friedrich. (2010) Identification of iron-reducing microorganisms in anoxic rice paddy soil by ^{13}C -acetate probing. *ISME J.*, **4**, 267-278.
- Hori, T., M. Noll, Y. Igarashi, M. W. Friedrich, and R. Conrad. (2007) Identification of acetate-assimilating microorganisms under methanogenic conditions in anoxic rice field soil by comparative stable isotope probing of RNA. *Appl Environ Microbiol.*, **73**, 101-109.
- Joynt, J., M. Bischoff, R. Turco, A. Konopka, and C. H.

- Nakatsu. (2006) Microbial community analysis of soils contaminated with lead, chromium and petroleum hydrocarbons. *Microb Ecol.*, **51**, 209-219.
- Kojima, H., H. Fukuhara, and M. Fukui. (2009) Community structure of microorganisms associated with reddish-brown iron-rich snow. *Syst Appl Microbiol.*, **32**, 429-437.
- Komlos, J., R. K. Kukkadapu, J. M. Zachara, and P. R. Jaffe. (2007) Biostimulation of iron reduction and subsequent oxidation of sediment containing Fe-silicates and Fe-oxides: effect of redox cycling on Fe(III) bioreduction. *Water Res.*, **41**, 2996-3004.
- Liesack, W., S. Schnell, and N. P. Revsbech. (2000) Microbiology of flooded rice paddies. *FEMS Microbiol Rev.*, **24**, 625-645.
- Lovley, D. R. (1991) Dissimilatory Fe(III) and Mn(IV) reduction. *Microbiol Rev.*, **55**, 259-287.
- Lovley, D. R., J. L. Fraga, J. D. Coates, and E. L. Blunt-Harris. (1999) Humics as an electron donor for anaerobic respiration. *Environ Microbiol.*, **1**, 89-98.
- Lovley, D. R., D. E. Holmes, and K. P. Nevin. (2004) Dissimilatory Fe(III) and Mn(IV) reduction. *Adv Microb Physiol.*, **49**, 219-286.
- Lovley, D. R. and E. J. Phillips. (1986) Availability of ferric iron for microbial reduction in bottom sediments of the freshwater tidal Potomac river USA. *Appl Environ Microbiol.*, **52**, 1472-1480.
- Lovley, D. R. and E. J. Phillips. (1987) Rapid Assay for Microbially Reducible Ferric Iron in Aquatic Sediments. *Appl Environ Microbiol.*, **53**, 1536-1540.
- Lovley, D. R. and E. J. Phillips. (1988) Novel Mode of Microbial Energy Metabolism: Organic Carbon Oxidation Coupled to Dissimilatory Reduction of Iron or Manganese. *Appl Environ Microbiol.*, **54**, 1472-1480.
- Lueders, T. and M. Friedrich. (2000) Archaeal population dynamics during sequential reduction processes in rice field soil. *Appl Environ Microbiol.*, **66**, 2732-2742.
- Nevin, K. P. and D. R. Lovley. (2002a) Mechanisms for accessing insoluble Fe(III) oxide during dissimilatory Fe(III) reduction by *Geothrix fermentans*. *Appl Environ Microbiol.*, **68**, 2294-2299.
- Nevin, K. P. and D. R. Lovley. (2002b) Mechanisms for Fe(III) Oxide Reduction in Sedimentary Environments. *Geomicrobiol J.*, **14**, 141-159.
- Noll, M., D. Matthies, P. Frenzel, M. Derakshani, and W. Liesack. (2005) Succession of bacterial community structure and diversity in a paddy soil oxygen gradient. *Environ Microbiol.*, **7**, 382-395.
- Radajewski, S., P. Ineson, N. R. Parekh, and J. C. Murrell. (2000) Stable-isotope probing as a tool in microbial ecology. *Nature*, **403**, 646-649.
- Radajewski, S., I. R. McDonald, and J. C. Murrell. (2003) Stable-isotope probing of nucleic acids: a window to the function of uncultured microorganisms. *Curr Opin Biotechnol.*, **14**, 296-302.
- Reguera, G., K. D. McCarthy, T. Mehta, J. S. Nicoll, M. T. Tuominen, and D. R. Lovley. (2005) Extracellular electron transfer via microbial nanowires. *Nature*, **435**, 1098-1101.
- Roden, E. E. (2006) Geochemical and microbiological controls on dissimilatory iron reduction. *C R Geosci.*, **338**, 456-467.
- Roden, E. E. and R. G. Wetzel. (2003) Competition between Fe(III)-reducing and methanogenic bacteria for acetate in iron-rich freshwater sediments. *Microb Ecol.*, **45**, 252-258.
- Scheid, D., S. Stubner, and R. Conrad. (2004) Identification of rice root associated nitrate, sulfate and ferric iron reducing bacteria during root decomposition. *FEMS Microbiol Ecol.*, **50**, 101-110.
- Treude, N., D. Rosencrantz, W. Liesack, and S. Schnell. (2003) Strain FAc12, a dissimilatory iron-reducing member of the *Anaeromyxobacter* subgroup of Myxococcales. *FEMS Microbiol Ecol.*, **44**, 261-269.
- Weber, K. A., L. A. Achenbach, and J. D. Coates. (2006a) Microorganisms pumping iron: anaerobic microbial iron oxidation and reduction. *Nat Rev Microbiol.*, **4**, 752-764.
- Weber, K. A., M. M. Urrutia, P. F. Churchill, R. K. Kukkadapu, and E. E. Roden. (2006b) Anaerobic redox cycling of iron by freshwater sediment microorganisms. *Environ Microbiol.*, **8**, 100-113.
- Winch, S., H. J. Mills, J. E. Kostka, D. Fortin, and D. R. Lean. (2009) Identification of sulfate-reducing bacteria in methylmercury-contaminated mine tailings by analysis of SSU rRNA genes. *FEMS Microbiol Ecol.*, **68**, 94-107.
- 山本鎔子, 大高明史, 林卓志, 福原晴夫, 野原精一, 落合正宏, 尾瀬アカシボ研究グループ (2004) 東北地方の赤雪. 陸水学会誌, **65**, 181-191.
- Yamamoto, Y., A. Ohtaka, T. Hayashi, H. Fukuhara, S. Nohara, and M. Ochiai. (2006) Spring red snow phenomenon caused by iron accumulated around algal spores in alpine mires in Japan. *Verh Internat Verein Limnol.*, **29**, 1947-1950.
- 山本鎔子, 林卓志, 落合正宏, 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 —. 陸水学会誌, **67**, 209-217.
- Yao, H., R. Conrad, R. Wassmann, and H. U. Neue. (1999) Effect of soil characteristics on sequential reduction and methane production in sixteen rice paddy soils from China, the Philippines, and Italy. *Biogeochemistry.*, **47**, 269-295.
- 矢田浩 (2005) 鉄理論＝地球と生命の奇跡, 講談社, 東京.