

(11) 広瀬川河川水からの *Bacillus* 属細菌捕食性原生動物の単離および解析

須藤 真志¹・中村 寛治^{1,2*}

¹東北学院大学大学院工学研究科 (〒985-8537 宮城県多賀城市中央一丁目13-1)

²東北学院大学工学部環境建設工学科 (同上)

* E-mail: knaka@tjcc.tohoku-gakuin.ac.jp

Bacillus 属細菌を被食者として使用し、仙台市内の広瀬川河川水中に生息する細菌捕食性原生動物の単離および解析を行った。3ヶ所のサンプリングポイントから河川水を採取、*Bacillus* 属細菌を添加して、捕食実験を行った。合計4回の捕食実験を行い、その後、希釈法によって4種類の細菌捕食性原生動物を単離した。18S rRNA遺伝子の塩基配列の解析から、2種類の原生動物はStramenopilesに属するもの、残りの2種類は、それぞれRhizariaとEuglenozoaに属するものであることが分かった。単離した原生動物を使用して、原生動物1細胞の増加に必要な*Bacillus* 菌の個数を算出したところ、約30～80個の範囲となった。さらに、原生動物1細胞当たりの18S rRNA遺伝子のコピー数を計測した結果、約30～220コピーの範囲となった。

Key Words : *Bacillus*, grazing, 18S rRNA, protozoa, river water, flagellate

1. はじめに

Bacillus 属細菌は自然界に広く分布しているグラム陽性細菌であり、環境浄化の分野での適用例は多い。本細菌のような分解能力に優れた細菌が、水質改善のために特定細菌として河川等の水環境に放出された場合、長く生存し、その分解能力が発揮されることが望ましい。しかし、一方で、その様な外来細菌は速やかに数を減少させることが、微生物生態系保全の観点からは望ましい。

何れのケースにおいても、放出された微生物の環境中での具体的な挙動を把握し、その理解に基づいて利用していくことが求められる。しかしながら、この様な微生物の挙動追跡に関連する知見が極めて少ないのが現状である。

これまで我々は、*Bacillus* 属細菌が一般的な水環境である河川中に添加された場合を想定して、実際の河川水である、仙台市内を流れる広瀬川河川水に本細菌を添加し、その挙動を調査した。その結果、広瀬川河川水には、原生動物が生息しており、添加された *Bacillus* 属細菌は、土着の原生動物によって速やかに捕食されることが明らかとなった¹⁾。

しかしながら、これまで我々の研究では、このような原生動物を単離出来ていなかったため、原生動物の収率や原生動物1細胞当たりの18S rRNA遺伝子数等の基礎

データを得ることはできなかった。そこで本研究では、広瀬川河川水中に生息する細菌捕食性原生動物を単離し、その原生動物に関するこれら基礎データの取得を行った。

2. 実験方法

2.1 使用した *Bacillus* 属細菌

実験に使用した *Bacillus* 属細菌は、廃水中の油脂成分を低減する効果があるとして商品化されたものであり、活性汚泥処理における汚泥生成量を減らすためにも利用されている。これは2009年の研究報告¹⁾で利用した *Bacillus* 属細菌と同じものであり、以下BY細菌とする。BY細菌の16S rRNA遺伝子は *Bacillus* sp. LD153の16S rRNA遺伝子 (Accession Number: AM913923) と塩基配列は100%一致する¹⁾。

2.2 河川水の採水

Bacillus 属細菌の捕食実験を行うため、仙台市内を流れる広瀬川の河川水を利用した。合計3ヶ所のサンプリングポイント (Sp) で採水を行い、図-1にそれらSp (①～③)を示す。Spの名称は、Sp1: 作並川崎、Sp2: 生瀬橋、Sp3: 大橋とした。採水した河川水は、採水後4℃保存にて運搬し、採水後8時間以内に捕食実験に使

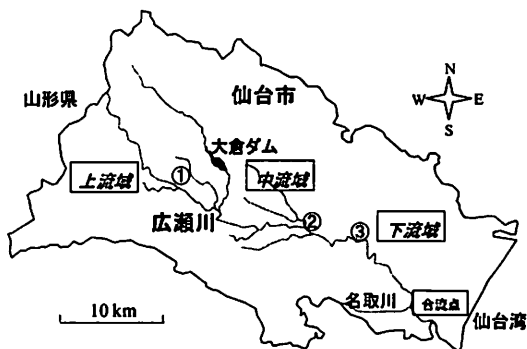


図-1 広瀬川のサンプリングポイント

用した。

2.3 原生動物の単離

被食者の *Bacillus* 属細菌である BY 細菌の培養には、LB 培地を利用し、コロニーを植種後、200 rpm、30°C で一晩振とう培養を行った。その後、Nutrient broth soyotone yeast extract inorganic basal medium²⁾ (NSY-IB) を 10 倍希釈した希釈 NSY-IB (以下、DNSY-IB) で 2 回洗浄 (11,100×g、5 min、4°C で集菌し、上澄みを捨て、DNSY-IB に懸濁) し、最終的に DNSY-IB に懸濁、一晩、200 rpm、20°C で振とう培養した後、使用した。捕食実験では、試験管に採水した河川水 4.85 mL に本 BY 細菌懸濁液 0.15 mL を添加し、吸光光度計 (タイテック社製、Mini photo 518R) にて 600 nm での吸光度 (A_{600}) が約 0.2 (5×10^7 cells/mL) になるように調整した。その後、本試験管を 180 rpm、20°C で振とう培養し、吸光度の値が初期値の 20% 以下になった時点で培養を終了した。サンプル中で優占化した捕食性原生動物を希釈法によって純化するため、DNSY-IB を使ってサンプル原液から 10 倍段階希釈液 (希釈倍率は $10^1 \sim 10^6$ とした) を作成した。希釈原生動物含有液 0.1 mL を上記のように調整した 4.9 mL BY 細菌懸濁液 (A_{600} 約 0.2) に添加した。希釈段階毎に 3 本を用意し、180 rpm、20°C で振とう培養を行った。その後、濁度が低下した最大希釈域の培養液を選出した。選出した培養液は再び希釈操作を行った。希釈による純化は合計 3 回繰返し、原生動物を単離した。単離した原生動物からの DNA 抽出は、既報の論文¹⁾ に示した通りに行った。

2.4 T-RFLP 解析

単離した原生動物の DNA 抽出液をテンプレートに、表-1 の Ek-SSU-83f と Ek-SSU-1763r のプライマーペアを使って真核生物の 18S rRNA (Small Subunit rRNA) 遺伝子を PCR 増幅した。Ek-SSU-83f の 5'末端は 6-carboxy-fluorescein (6-FAM) で標識し、Ek-SSU-1763r の 5'末端は 2,7,8-benzo-5-

fluoro-2,4,7-trichloro-5-carboxyfluorescein (NED) で標識したもの (アプライドバイオシステムズ社製) を、DNA ポリメラーゼは Ex Taq Hot Start Version (タカラバイオ社製) を使用した。PCR 反応は、Pre-heating; 94°C、2 分に続き、熱変性; 94°C、20 秒、アニーリング; 58°C、30 秒、伸長反応; 72°C、100 秒を 30 サイクル繰返し、Post extension; 72°C、7 分を行った。PCR 産物はマイクロスピナラム S-300 HR (GE ヘルスケア社製) で精製後、適量を制限酵素 *Bst*UI (New England Biolabs 社製) で切断した。続いて Sephadex G-50 (GE ヘルスケア社製) を蒸留水で膨潤させたものでろ過し、脱塩処理を行った。その後、3130 Genetic Analyzer (アプライドバイオシステムズ社製) により Gene Mapper モードで運転、解析 (Gene Mapper 3.7 を使用) を行い、Terminal Restriction Fragment (T-RF) のピークデータ (0~600 bases の範囲) を取得した。T-RF ピークデータは 18S rRNA 遺伝子の 5'末端および 3'末端に関して得られたが、本研究では 5'末端の 6-FAM による解析結果のみを利用した。また、内部標準には GeneScan500 ROX (ROX: 6-carboxy-X-rodamine, アプライドバイオシステムズ社製) を利用した。

2.5 単離原生動物の 18S rRNA 遺伝子の解析

単離した原生動物の DNA 抽出液を基に、前項の 2.4 と同様に、表-1 の Ek-SSU-83f と Ek-SSU-1763r のプライマーペアを使って 18S rRNA 遺伝子を PCR 増幅した。PCR 増幅産物は、マイクロスピナラム S-300HR によりプライマーを除去した後、ダイレクトシーケンシングを行った。DNA シーケンシング用試薬、BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kits (アプライドバイオシステムズ社製) により、添付マニュアルに従って反応、処理を行い、3130 Genetic Analyzer で塩基配列を決定した。PCR 増幅に利用した 2 種類のプライマーに加えて、4 種類のユニバーサルプライマー、Ek-SSU-558f, Ek-SSU-1253f, Ek-SSU-551r, Ek-SSU-1254r (表-1) を使って全域の塩基配列を両方向から決定した。決定した塩基配列データは、インターネット上で National Center for Biotechnology Information (NCBI) に送付、近縁種を決定した。加えて DNA Data Bank of Japan (DDBJ) にて Clustal W による系統解析を行い、Tree View にて系統樹を作成した。

2.6 単離原生動物による捕食実験

単離した原生動物を使って捕食実験を行い、原生動物に関する基礎データを取得した。捕食実験では 2.3 に記した手順によって A_{600} を約 0.2 に調整した 5 mL の BY 細菌懸濁液を準備した。本懸濁液に、単離原生動物を添加し、実験に使用する原生動物の前培養を行った。続いて、前培養液 0.01 mL を、新たな BY 細菌懸濁液 (A_{600} 約

表-1 本研究で使用したプライマー

プライマー名	塩基配列 (5' → 3')	長さ (bases)	18S rRNA遺伝子 中の位置*	文献
(18S rRNA遺伝子増幅・解析用)				
Ek-SSU-83f	AAA CTG CGA ATG GCT CAT	18	83-100	1
Ek-SSU-558f	GCC GCG GTA ATT CCA GCT	18	558-575	1
Ek-SSU-1253f	TGG TGG TGC ATG GCC G	16	1253-1268	1
Ek-SSU-551r	ATT ACC GCG GCT GCT GGC	18	568-551	1
Ek-SSU-1254r	GAA CGG CCA TGC ACC ACC	18	1271-1254	1
Ek-SSU-1763r	ATC CTT CTG CAG GTT CAC CTA C	22	1784-1763	1

*Type Strain - *Ochromonas danica* 18S rRNA gene (Accession No: M32704)での位置

0.2) に添加し、180 rpm、20℃で振とう培養を行い、捕食を行わせた。なお、本培養条件ではBY細菌の増殖は確認できなかった。 A_{600} の値が初期値の20%以下になった時点で、デジタルカメラ（ZEISS社製 AxioCam MRc5, AxioVision Rel.4.6）を装着した光学顕微鏡（ZEISS社製 Axio Imager.A1）により、位相差モードで原生動物を観察、写真撮影を行った。また、増加した原生動物数を計測するため、トーマ血球計算盤（エルマ社製）を使用して、1つの試料につき、4回計測を行った。本計測値より、原生動物数の平均値、および標準偏差を算出した。次に、初期のBY細菌数を基に、低下した吸光度から減少したBY細菌数を算出した。この際、対照系（原生動物無添加）での低下を自然減として、捕食細菌数から差し引いた。この減少したBY細菌数を、増加原生動物数で除して、収率（原生動物1細胞の増加に必要な捕食されたBY細菌数）を算出した。

2.7 qPCRによる18S rRNA遺伝子の定量

捕食実験による単離した原生動物の増加を確認するため、サンプル中の18S rRNA遺伝子をqPCR (quantitative real-time PCR) 法によって、既報の論文に従って定量した⁹⁾。測定は3回行い、平均値および標準偏差を算出した。

3. 実験結果

3.1 T-RFLPによる純化の確認

希釈法によって単離した4種類の原生動物は、Ptz1~4とした。Ptz1は2009/10/7にSp1より採水した河川水より単離した。同様に、Ptz2は2009/12/11にSp1より採水した河川水より単離、Ptz3は2009/12/11にSp2より採水した河川水より単離、Ptz4は2009/10/7にSp3より採水した河川水より単離した。単離元の河川水の水質データを表-2に示す。各々の単離原生動物の培養液からDNAを抽出し、T-RFLP解析を行い、図-2に示す結果を得た。いずれの原生動物もピークが1本だけ出現したため、それぞれ1種類の原生動物が分離できたと判断した。ピーク出現位置は、Ptz1:342.2 bases, Ptz2:119.6 bases, Ptz3:

105.6 bases, Ptz4:339.4 basesであった。

また、単離した原生動物 Ptz1~4 までの顕微鏡写真を図-3のA~Dにそれぞれ示す。Ptz1, 2, 4は5 μm程度の大きさ、Ptz3は10 μm程度の大きさで、いずれも鞭毛を持っていた。

表-2 単離実験に使用した河川水

採水地点	採水日	水温(℃)	pH	電気伝導度 (mS/m)
Sp1	2009/10/7	16.5	7.39	18.21
Sp1	2009/12/11	21.0	6.92	11.06
Sp2	2009/12/11	22.8	7.37	14.52
Sp3	2009/10/7	17.4	8.28	23.10

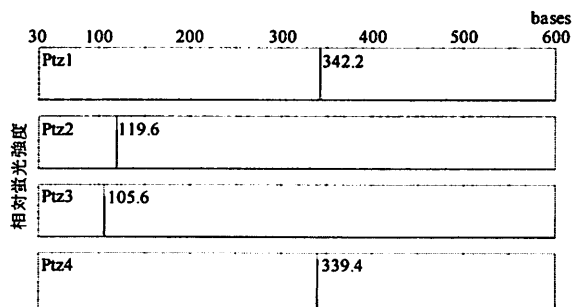


図-2 単離した捕食性原生動物のT-RFプロフィール

3.2 単離原生動物による捕食実験

単離原生動物によるBY細菌の捕食による吸光度 A_{600} の経時変化を図-4に示す。図中のControlは原生動物無添加系であり、細菌の吸光度の自然減衰を表している。BY細菌懸濁液は4日目にPtz1添加系とPtz4添加系で A_{600} が初期値の20%以下となり、同様にPtz2添加系は5日目、Ptz3添加系は6日目まで20%以下となった。また、Controlは、添加系で A_{600} が初期値の20%以下となった時点で初期値の70%程度となり、各系での吸光度の低下は、Controlに対して有意であることが分かる。顕微鏡による観察では、全ての試料でBY細菌を捕食したと思われる5~10 μmの大きさの原生動物が確認された。また、トーマ血球計算盤にて、原生動物の濃度を計測した結果、

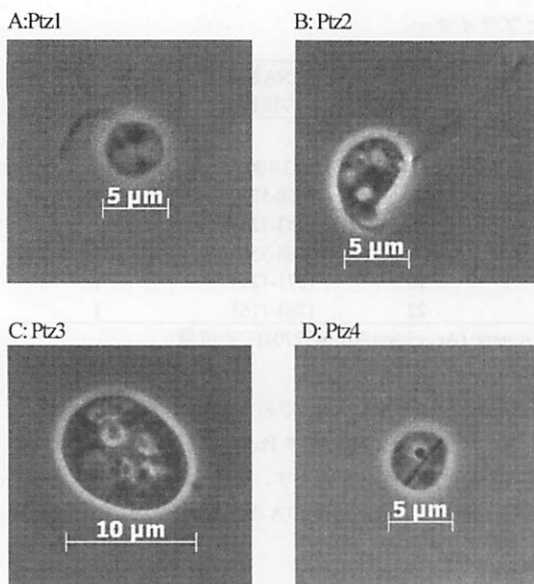


図-3 単離した原生動物
(A: Ptz1, B: Ptz2, C: Ptz3, D: Ptz4)

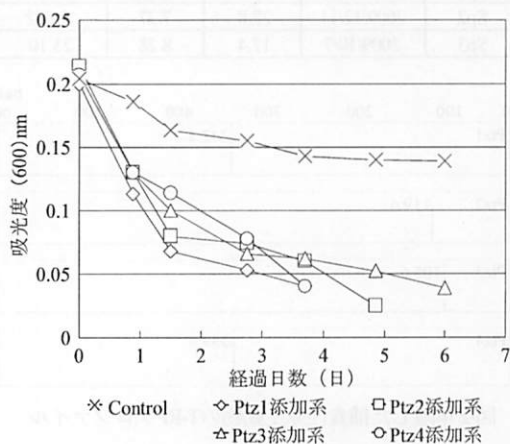


図-4 単離した原生動物による吸光度経時変化

Ptz1 は 8.1×10^5 cells/mL, Ptz2 は 1.2×10^6 cells/mL, Ptz3 は 4.9×10^5 cells/mL, Ptz4 は 7.2×10^5 cells/mL となった。各捕食実験で、低下した濁度から Control の値を差し引いた値を捕食による細菌数の減少と仮定し、 $A_{600}=0.2$ が 5×10^7 cells/mL であることから、比例計算により、捕食された BY 細菌数を算出、上記の原生動物数で除して、原生動物 1 細胞の増加に必要な BY 細菌数を算出し、図-5 に示す結果を得た。Ptz1 に関しては、標準偏差の値が大きくなったが、約 50 cells/Ptz の値が得られた。予想通り、サイズの最も大きかった Ptz3 の値が最も大きく約 60 cells/Ptz となった。

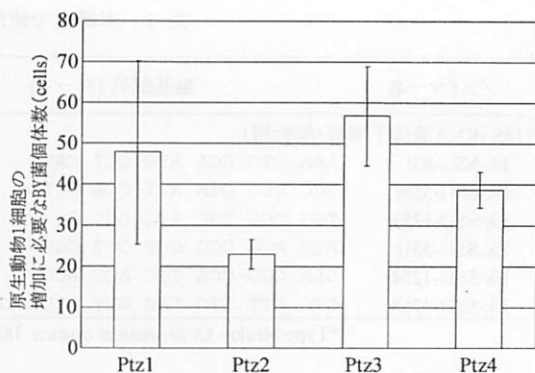


図-5 原生動物 1 細胞の増加に必要な BY 細菌数

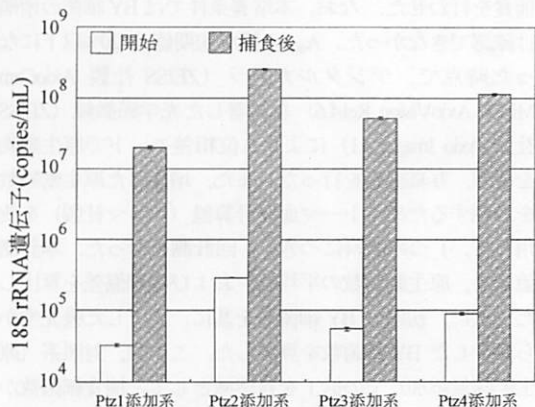


図-6 捕食試験前後の 18S rRNA 遺伝子数の変化

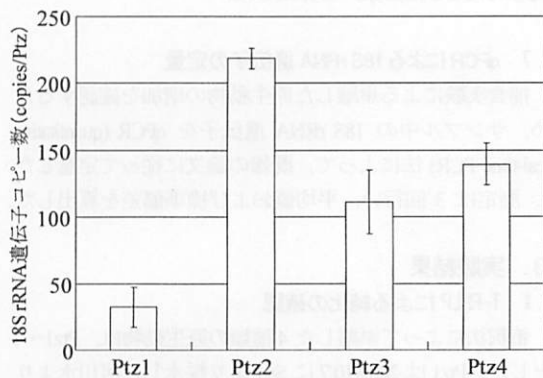


図-7 原生動物 1 細胞の 18S rRNA 遺伝子コピー数

3.3 qPCRによる全18S rRNA遺伝子の定量

先の捕食実験で、原生動物の細胞数を計測したサンプルから、DNAを抽出し、サンプル中の 18S rRNA 遺伝子数を qPCR により計測した。また、捕食実験のために行った前培養での最終遺伝子数も計測し、捕食実験開始時に 1/500 の割合で添加した際の、初期濃度も算出した。これらの計測値を図-6 に示す。なお、図-6 の捕食後のデ

ータは、図4の吸光度が初期値の20%以下になった時点の値である。Ptz1~4 全てにおいて捕食前後で2オーダー以上の18S rRNA 遺伝子数の増加が確認でき、BY細菌の捕食による原生動物の増加が、18S rRNA 遺伝子の定量によっても確認できた。

次に、捕食後の18S rRNA 遺伝子数を前項で計測した原生動物数で除して、原生動物1細胞当たりの18S rRNA 遺伝子コピー数を算出し、図7に示す結果を得た。本コピー数は、原生動物の種類によって大きく異なり、最小値はPtz1の32 copies/Ptz、最大値はPtz2の219 copies/Ptzとなり、約7倍の差があった。

3.4 単離原生動物の系統解析

単離した原生動物の抽出DNAを基に18S rRNA 遺伝子をPCR増幅し、その塩基配列を決定した。決定した塩基配列はNCBIのBlastによって解析を行い、近縁種を決定し、表3に示す結果を得た。Ptz1~4 までのPCR増幅産物の長さはPtz2を除いて約1700basesであった。Ptz2は最も長く約2000 basesの長さであった。Ptz1はStramenopilesの*Spumella obliqua*, Ptz2はEuglenozoaの*Bodo saltans*, Ptz3はRhizariaの*Lecythium* sp., Ptz4はStramenopilesの*Spumella* sp. Mbc_3Cに近縁な原生動物であることが明らかとなった。

決定した18S rRNA 遺伝子の塩基配列を基に、ClustalWにより図8に示す系統樹を作製した。図中のBXO-Chn○は、過去、広瀬川河川水に*Bacillus* 属細菌であるBX細菌を添加して増殖した原生動物の18S rRNA 遺伝子クローンである¹⁾。同様に、BYO-Chn○は、過去、広瀬川河川水に本研究で利用したBY細菌を添加して増殖した原生動物の18S rRNA 遺伝子クローンである¹⁾。Ptz1, Ptz4は、河川水に*Bacillus* 属細菌を添加し捕食実験を行った際に優占化した多くの原生動物と同様にStramenopilesのChrysophyceaeに分類された。また、Ptz3はBX3-Chn6と同様のRhizariaの*Cercozoa*に分類された。一方、Ptz2に関してはこれまで捕食によって優占化した原生動物とは、大きく異なり、EuglenozoaのKinetoplastidaに分類された原生動物であることがわかった。

4. 考察

仙台市内を流れる広瀬川の3ヶ所から河川水を採取、*Bacillus* 属細菌であるBY細菌を添加して、捕食実験を行い、出現した原生動物の単離を試みた。各捕食試験で優占化する原生動物が出現し、希釈法を3回繰り返して単離を行うことが出来た。単離した原生動物が1種類か否かの確認を行うため、T-RFLP解析を行った結果、それぞれの原生動物でピークが1つしか出現しなかったことから、それぞれの河川水から、1種類の原生動物が単離

できたと判断した。

単離した原生動物 Ptz1~4 により、BY 細菌（細菌濃度 $A_{600}=0.2$ ）を被食者として捕食実験を行うと、図4に示した様に、Ptz1, 4では4日以内、Ptz2では5日以内に初期値の20%以下に低下、最も遅かったPtz3でも6日以内にそのレベルまで低下した。既報の論文では、河川水を利用してBY細菌による捕食実験を行った場合、全てのケースで3日以内に初期値の20%以下に低下しており¹⁾、本研究で単離したPtz1, 4と同程度の捕食速度を持っていることが分かる。

また、原生動物1細胞の増加に必要なBY細菌数は図5に示すように20~60 cellの間であり、Ptz3が最も大きな値となったが、図3の写真からPtz3の細胞が最も大きなサイズであり、矛盾しない。

qPCRにより、捕食前後の18S rRNA 遺伝子数を測定し、捕食によって原生動物が増殖したことを確認したが、捕食後の遺伝子数は $10^7 \sim 10^8$ copies/mLとなった。既報の河川水にBY細菌を添加した実験では、同様の条件で、 10^7 copies/mL前後となり¹⁾、本実験での値が若干大きい。混合系の河川では、他の因子によって、添加細菌数の低下が起きているのかも知れない。また、本実験で利用した培地中の無機成分が、原生動物の捕食により適している可能性もある。

qPCR測定値を基に算出した単離原生動物1細胞当たりの18S rRNA 遺伝子コピー数は、32~219 copies/cellであり、かなり幅広く、18S rRNA 遺伝子を基に原生動物数を推定する場合は、対象原生動物によってその換算値が大きく異なることに注意する必要がある。

単離した原生動物の18S rRNA 遺伝子の系統解析を行った結果、Ptz1, Ptz4に関しては、河川水にBY細菌を添加し、捕食実験を行った際に優占化した多くの原生動物¹⁾と同様にStramenopilesのChrysophyceaeであった。Ptz3はBX細菌を利用した際に出現したBX3-Chn6と同様のRhizariaの*Cercozoa*に分類された。しかしPtz2に関してはこれまで捕食によって優占化した原生動物とは、大きく異なり、EuglenozoaのKinetoplastidaに分類された原生動物であることがわかった。

今回単離することの出来たPtz1, Ptz4は、過去*Bacillus* 属細菌を広瀬川河川水に添加した際に優占化した原生動物や、グラム陰性細菌である*Cypridiavicus necator* KT1の捕食者³⁾として検出されている原生動物に近縁である。また、Ptz1, Ptz4が属するChrysophyceaeは、世界中の淡水、海水や土壌に存在している^{4,5,6)}ことが明らかとなっており、本分類の原生動物は広く自然界に分布していると推察される。さらに、図6のデータを利用して、捕食実験期間中での平均的な比増殖速度を算出すると、Ptz1は1.7d⁻¹、Ptz2は1.4d⁻¹、Ptz3は1.1d⁻¹、Ptz4は1.9d⁻¹となっ

表-3 取得18S rRNA遺伝子の解析結果

単離 原生動物	単離 地点名	被食者	T-RF 理論値 (bases)	T-RF 計測値 (bases)	解析対象	決定 塩基配列 (bases)	NCBI最近縁種 Accession No.	大分類	最近縁種名	相同性 (%)	Accession No.
Ptz1	Sp1	BY細菌	341	342.2	PCR Product	1665	AJ236860	Stramenopiles	<i>Spumella obliqua</i>	98	AB585964 (登録株名: <i>Spumella</i> sp. TGS1)
Ptz2	Sp1	BY細菌	125	119.6	PCR Product	2023	AY028452	Euglenozoa	<i>Bodo saltans</i>	100	AB585965 (登録株名: <i>Bodo</i> sp. TGS2)
Ptz3	Sp2	BY細菌	109	105.6	PCR Product	1691	AJ514867	Rhizaria	<i>Lecythium</i> sp.	95	AB585966 (登録株名: <i>Cercospora</i> sp. TGS3)
Ptz4	Sp3	BY細菌	340	339.4	PCR Product	1665	AB425951	Stramenopiles	<i>Spumella</i> sp. Mbc_3C	99	AB585967 (登録株名: <i>Spumella</i> sp. TGS4)

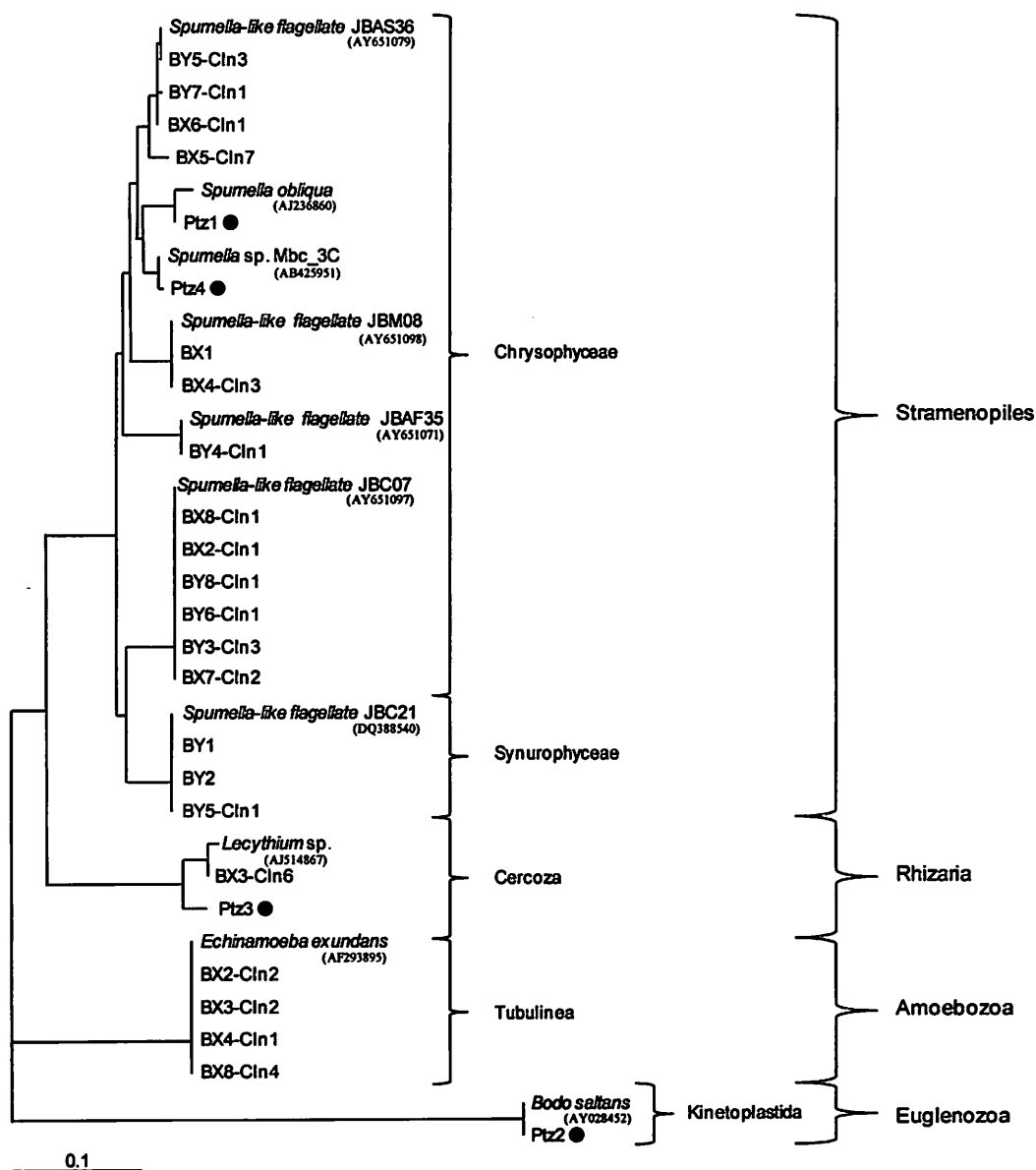


図-8 広瀬川における *Bacillus* 属細菌捕食性原生動物の18S rRNA遺伝子の系統樹
 (系統樹は近隣接合法-Kimuraの方法により作成
 BX○-Cln○は、河川水にBX菌を入れた際に優占化した原生動物
 BY○-Cln○は、河川水にBY菌を入れた際に優占化した原生動物
 ●は今回単離した原生動物 括弧内は最近縁種Accession No.)

た。これらの値は、須藤らが活性汚泥から単離した原生動物で報告している原生動物、*Vorticella microstom* の最大比増殖速度 $\mu_{max}=2.2\text{ d}^{-1}$ 、*Colpidium comphyum* の $\mu_{max}=2.9\text{ d}^{-1}$ 、*Opercularia* sp. の $\mu_{max}=2.3\text{ d}^{-1}$ と近い領域にある。また、Ptz1 と Ptz4 と近縁である鞭毛虫の *Ochromonas* sp. に *Pseudomonas pwaqwataisonaeh sousrutida* MM1 株を捕食させた場合に、約 2 d^{-1} の比増殖速度が観察されており⁸⁾、本実験での測定値と極めて近い。この様に、今回単離した原生動物はこれまでに報告されている原生動物と同程度の増殖速度を有することが確認された。

本研究では、河川中に生息する、*Bacillus* 属細菌捕食性の原生動物を単離し、捕食速度や細菌を捕食した場合の収率、原生動物 1 細胞当たりの 18S rRNA 遺伝子コピー数等の基礎データを得ることが出来た。今後は、これら基礎データを利用して詳細な捕食挙動の解析を進めると共に、本原生動物の他の細菌種への捕食挙動の調査を行い、自然界での役割調査をさらに進めて行きたい。

* 本研究の一部は、平成 22 年度科学研究費基盤研究 B 課題番号 22360216 の助成を受けて実施したものである。

参考文献

1) 須藤真志, 高野智博, 中村寛治: *Bacillus* 属細菌を捕食する河川中の原生動物の解析, 環境工学研究論文集, Vol.46, pp.511-

519, 2009.

- 2) Hahn, M. W., H. Lünsdorf, Q. Wu, M. Schauer, M. G. Höfle, J. Boenigk, and P. Stadler: Isolation of novel ultramicrobacteria classified as actinobacteria from five freshwater habitats in Europe and Asia, *Appl. Environ. Microbiol.*, Vol.69, pp.1443 - 1451, 2003.
- 3) 柿あや, 奥山加代子, 中村寛治: 特定細菌放出に伴う土着細菌群集への影響: 評価手法の検討, 環境工学研究論文集, Vol.45, pp.203-210, 2008.
- 4) Boenigk, J., K. Pfändl, P. Stadler, and A. Chatzinotas: High diversity of the “*Spumella*-like” flagellates: an investigation based on the SSU rRNA gene sequences of isolates from habitats located in six different geographic regions, *Environ. Microbiol.*, Vol.7, pp.685 - 697, 2005.
- 5) Boenigk, J., K. Pfändl, T. Garstecki, H. Harms, G. Novarino, and A. Chatzinotas: Evidence for geographic isolation and signs of endemism within a protistan morphospecies, *Appl. Environ. Microbiol.*, Vol.72, pp.5159-5164, 2006.
- 6) Boenigk, J., S. Jost, T. Stoock, and T. Garstecki: Differential thermal adaptation of clonal strains of aprotist morphospecies originating from different climatic zones, *Environ. Microbiol.*, Vol.9, pp.593-602, 2007.
- 7) 須藤隆一: 活性汚泥処理における原生動物の役割に関する研究, 理学博士学位論文, p.478, 1974.
- 8) Matz, C., P. Deines, J. Boenigk, H. Arndt, L. Eberl, S. Kjelleberg, and K. Jürgens: Impact of violacin-producing bacteria on survival and feeding of bacterivorous nanoflagellates, *Appl. Environ. Microbiol.*, Vol.70, pp.1593 - 1599, 2004.

(2010.5.21 受付)

Analysis of Protozoa Isolated from the Hirose River, That Graze Bacteria belonging to Genus *Bacillus*

Masashi SUTO¹ and Kanji NAKAMURA^{1,2}

¹Graduate school of Engineering, Tohoku Gakuin University

²Dept. of Civil and Environmental Engineering, Tohoku Gakuin University

Protozoa, that grazed bacteria belonging to genus *Bacillus*, Gram-positive bacteria, isolated from the Hirose River were analyzed. Three sampling points were set along the river, and river water samples were used for grazing experiments with the bacteria. Four protozoa were isolated by using the dilution method. The 18S rRNA gene analyses showed that 2 protozoa belonged to Stramenopiles and other 2 protozoan belonged to Rhizaria and Euglenozoa, respectively. Numbers of bacteria needed for a protozoan cell increase were ranged from 30 to 80 cells. Also, copy numbers of 18S rRNA gene per a protozoan cell were ranged from 30 to 220 copies.