

[J. Ferment. Technol., Vol. 49, No. 7, p. 587~591, 1971]

## 鉄酸化細菌の生育, 鉄酸化能などに及ぼす 有機源の影響

宇佐美昭次, 杉谷 透

(早稲田大学理工学部応用化学科)

### The Effect of Organic Substances on the Growth and Iron Oxidation Activity of Iron Oxidizing Bacteria

Shoji Usami and Toru Sugitani

(Department of Applied Chemistry, Faculty of Science and Engineering,  
Waseda University, Nishiokubo, Shinjuku-ku, Tokyo)

Glucose was assimilated effectively by iron oxidizing bacteria, WU-66 B, up to about 0.2 % (w/v). Both of the growth and iron oxidizing activity were inhibited almost completely in the presence of glucose more than 0.3 %. When glucose was added to 9 K medium, the medium for autotrophic growth, both of the growth and iron oxidation were delayed in the early stage of culture, but the delays were restored at least within 48 hr of cultivation.

Malt extract was assimilated effectively up to about 0.15 % (w/v) and the delay of the growth and iron oxidation in the early stage of culture was also found in this case.

Organic nitrogen sources, peptone and urea were assimilated by WU-66 B. When peptone was added to the 9 K medium instead of ammonium sulfate, the growth was increased but iron oxidizing activity was decreased. It was presumed that peptone was assimilated as a carbon source too, and could not be utilized as an energy source. When urea was added to the 9 K medium instead of ammonium sulfate, the growth was decreased slightly and less iron oxidation activity was found.

#### 緒 言

バクテリアのエネルギー誘導機構を利用したバクテリア・リーチングは近年各国で盛んに研究されているが, その関与微生物である鉄酸化細菌, イオウ酸化細菌は化学合成独立栄養性細菌 (chemoautotrophic bacteria) であり, 第一鉄あるいはイオウ化合物を酸化し, その間のエネルギーを生活エネルギーとして独立栄養的に生育するとされている<sup>1)</sup>. すなわち炭素源としては炭酸ガスを, 窒素源としては無機の窒素を利用しているといわれるが, 近年, *Thiobacillus thiooxidans*, *Ferrobacillus ferrooxidans* のような絶対独立栄養

性細菌 (obligate autotrophic bacteria) の有機源培地での生育の可能性<sup>2-3)</sup> や有機物代謝能力<sup>4)</sup> が議論されている. 著者らは, 第一鉄を唯一のエネルギー源として独立栄養的に生育し得る鉄酸化細菌 WU-66B 菌をすでに分離し, 菌学的性質等について研究を行ってきたが<sup>5)</sup>, ここでは WU-66B 菌の生育, 鉄酸化能などに及ぼす有機源の影響について検討した結果を報告する.

#### 実験条件および方法

1. 使用菌株 本研究に用いた菌株は, 秋田県同和小坂鉱山排水中より分離したもので<sup>5)</sup>, その諸性質は

Table 1. Some characteristics of WU-66B and *Thiobacillus ferrooxidans*.

			WU-66B	<i>T. ferrooxidans</i> *
Shape and size ( $\mu$ )			short rods, 0.3×1.0	short rods, 0.5×1.0
Optimum temp. (°C)			30	30
Optimum pH-value			1.5—4.0	2.5—5.8
Gram stain			—	—
Motility			+	+
Nitrogen source	KNO <sub>3</sub>		—	(+)
	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>		+	+
Energy source	Liquid medium	FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	+	+
		S°	—	—
		Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> ·5H <sub>2</sub> O	+	+
	Agar medium	FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	+	+
		Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> ·5H <sub>2</sub> O	+	+
	Silica gel medium	FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	+	+
Isolation source			mine water (Dowa Kosaka mine)	

\* after Yagi<sup>6)</sup>

Table 1 に示した通りである。本菌はエネルギー源として第一鉄の他にチオ硫酸ナトリウムを酸化して生育し、他の生理的特質からも、*Thiobacillus ferrooxidans* であろうと考えられる。

2. 培養 独立栄養的な生育の培地としては、

Table 2 に示した組成の 9 K 培地を用いた。液内培養

Table 2. Composition of 9K medium.

Basal salts	
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	3.0 g
KCl	0.1 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.5 g
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.5 g
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	0.01 g
10NH <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1.0 ml
Distilled water	700 ml
Energy source	
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	14.74% solution 300 ml

は 500 ml のエルレンマイヤー・フラスコに培養液 100 ml を入れて行なった。培地の滅菌はエネルギー源である FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O と basal salts とを、別々に行ない、初発 pH としては、鉄酸化、生育共に良好な 2.5

に調節した<sup>5)</sup>。活性の高い 2 ml の洗浄菌懸濁液を接種に使用したが、接種液の濃度としては、96 時間培養後の鉄酸化、菌生育にほとんど差が出ない範囲のものを用いた<sup>5)</sup>。培養は 30 °C 恒温で回転振盪機 (200 rpm) にて行なった。

3. 分析 培養後の液には、FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O の変化した種々の不溶性物質や着色物質が菌と共に存在したが、一定時間、培養液を冷蔵、静置することにより、菌層と沈殿層とを分離でき、濾過によって菌のほとんどが存在する上澄み液を回収できたので、これの遠沈、洗浄を繰り返して洗浄菌体を得。これを定容後、波長 470 m $\mu$  で濁度測定を行なうことにより菌生育を調べた。なおケルダール・ネスラー法にて菌体窒素量を求め、波長 470 m $\mu$  における O. D. との関係を調べたところ 菌体窒素量 [mg-N/l-broth] = O. D. × 23 であった。またエネルギー源である第一鉄量は過マンガン酸カリウムとの酸化還元反応を利用して測定し、培地 pH の変化を pH メーターで測定した。

#### 実験結果および考察

1. グルコースの影響 9 K 培地は炭素源として何も含有していないが、これにグルコースを 0～0.5 %

Table 3. Effect of the addition of glucose.

Glucose %(w/v)	0.00	0.01	0.05	0.10	0.20	0.30	0.50
Final pH	2.10	2.00	2.00	2.00	2.03	2.50	2.50
Rate of Fe <sup>++</sup> oxidation (%)	100	100	100	100	100	11.1	10.5
Cell growth (O.D. at 470 mμ)	0.120	0.125	0.131	0.143	0.161	0.029	0.018

(w/v) 添加して 96 時間培養した時の鉄酸化割合, 培地 pH, 菌生育を Table 3 に示した. 表からわかるように, グルコース濃度が 0.3% 以上では菌生育, 鉄酸化を阻害しているが, 0.2% までは炭素源として有効に資化していると考えられ, これは渡辺ら<sup>7)</sup>の結果とほぼ一致している.

9 K 培地と 9 K 培地に 0.1% のグルコースを添加したグルコース添加培地での本菌の生育曲線を Fig. 1 に示す. グルコース添加培地での増殖は培養初期に遅延

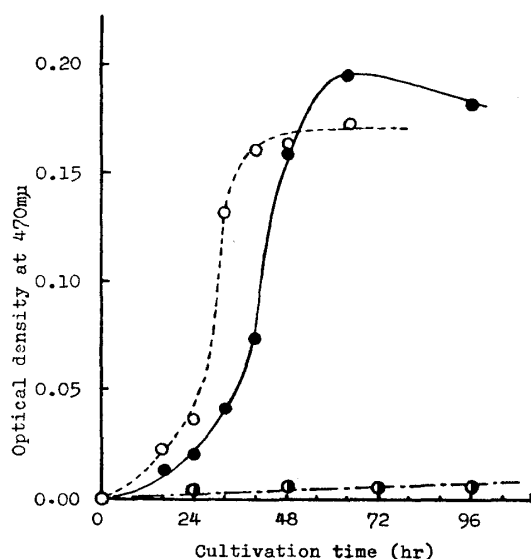


Fig. 1. Growth curve of WU-66B.

...○... 9 K medium  
—●— (9 K + glucose) medium  
--●-- control

がみられるが, この遅延も培養時間の経過につれて回復しており, 増殖の促進が起きている.

この両培地での鉄酸化および pH 変化を経時的に示したのが, Fig. 2 である. 9 K 培地に比べてグルコース添加培地では鉄酸化の遅延がみられる. この鉄酸化の遅延の度合いはグルコース添加量の増大につれて大きくなった. たとえば, グルコース濃度が 0, 0.01, 0.05, 0.10% における 24 時間培養後の鉄酸化割合は各々, 38, 31, 14, 5% であった. しかし, 48 時間培養後には, すべてほとんど 100% 鉄酸化が進行した. 培地 pH は両培地で同じ経過をたどったが, 鉄酸化の

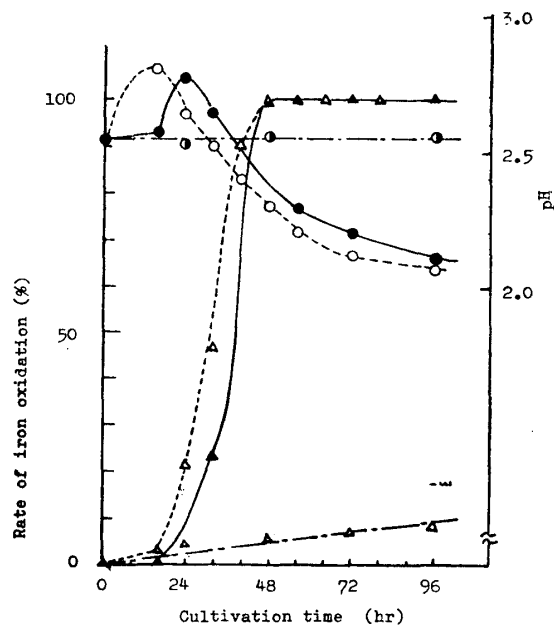
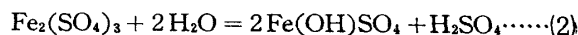
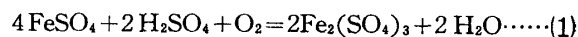


Fig. 2. Time course of iron oxidation and change of pH-value during the growth of WU-66B.

Rate of Fe<sup>++</sup>oxidation  
...△... 9 K medium  
—▲— (9 K + glucose) medium  
--△-- control  
pH  
...○... 9 K medium  
—●— (9 K + glucose) medium  
--●-- control

遅延に関連して, グルコース添加培地では, やはり遅延が認められた. 一般に鉄酸化細菌による鉄酸化機構は次の 2 式によって進行するとされており<sup>8)</sup>,



(1)の反応で酸化生成した Fe<sup>3+</sup> は pH 2.5~3.0 で(2)の加水分解反応によって Fe(OH)SO<sub>4</sub>として沈殿し, (1)のアルカリ化反応による pH 上昇もただちに(2)の酸性化反応によって pH 低下となるが, グルコース添加培地において, 8~16時間の遅延があっても 9 K 培地の時と同じ pH 変化をするということは, グルコース添加培地においても鉄酸化機構自体は変化していないことがわかる.

2. 麦芽エキスの影響 Table 4 は 9 K 培地に麦芽

Table 4. Effect of the addition of malt extract.

Malt extract %(w/v)	0.00	0.01	0.05	0.07	0.10	0.15	0.30
Final pH	2.00	1.96	1.92	1.97	1.97	2.59	2.59
Rate of Fe <sup>++</sup> oxidation (%)	100	100	100	100	100	6.5	6.0
Cell growth (O.D. at 470 mμ)	0.148	0.161	0.171	0.174	0.168	0.008	0.004

エキスを0~0.3%添加し、96時間培養した結果を示す。グルコース添加の時と同様に、ある濃度(0.15%)以上添加すると鉄酸化および生育を阻害しているが、0.1%以内においては本菌の増殖に利用されていることが考えられる。またグルコースの場合と同様に培養初期において鉄酸化、菌増殖が遅延したが、麦芽エキスの濃度が0.1%までは培養時間の経過につれて回復し、遅延した鉄酸化も48時間後には、ほぼ100%進行した。

3. 窒素源とくにペプトンの影響 Bergey<sup>9)</sup>の記載によると、*Thiobacillus ferrooxidans* は、一般にアンモニア態窒素でよく生育し、硝酸態窒素は、ほとんど利用しないとされているが、本菌は Table 1 に示した通り硫酸アンモニウムでよく生育し、硝酸カリウムでは、ほとんど生育せず、Bergey の記載とよく一

致した。本菌のような絶対独立栄養性細菌は窒素源として無機の窒素源を利用するとされており、有機態窒素の利用を検討する為に次の実験を行なった。9K 培地の窒素源である硫酸アンモニウムの代わりに尿素、L-アスパラギンをそれぞれ窒素量として同量入れ、またペプトンは50mg入れて培養した。Fig. 3 にこの結果を示した。有機アミノ態窒素である尿素では、無機アンモニア態の硫酸アンモニウムに比べて、鉄酸化能はかなり低下しているが菌生育は、わずかに劣る程度まで起こっており、同じアミノ態窒素の L-アスパラギンでは鉄酸化、菌生育共に阻害されている。ペプトンでは鉄酸化が硫酸アンモニウムの場合に比べて劣るのにもかかわらず、良好な菌生育がみられた。

ペプトンでの生育が良好なことから、ペプトン濃度の影響をまず検討した。硫酸アンモニウムのかわりにペプトンを0~0.2% 9K 培地に加え、96時間培養した結果を Table 5. に示した。ペプトン量としては、0.16%までは資化し、ペプトン量の増加と共に菌生育も伸びているが、鉄酸化は逆に徐々に抑えられており、ペプトン量増加につれて、単位菌体量当り(単位 O.D. 当り)の鉄酸化割合は減少している。そして0.2%以上となると鉄酸化、菌生育共にほとんど完全な阻害が起こっている。

ペプトンを加えた時に、鉄酸化がやや抑えられるのに対して、菌生育が伸びていることから、ペプトンが資化される時にエネルギー効率よく生育が起こり、大量の鉄酸化を必要としないことが考えられ、次の実験を行なった。硫酸アンモニウム、ペプトン、硫酸第一鉄を9K 培地の basal salts に加えて96時間培養した結果を Table 6. に示した。ここで+、-は培地中の

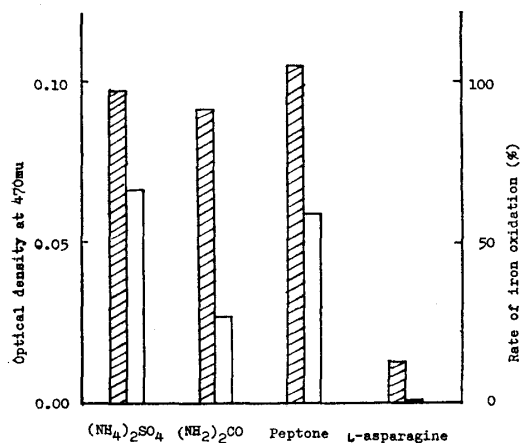


Fig. 3. Effect of nitrogen source

▨ Cell growth (O.D. at 470 mμ)  
□ Rate of Fe<sup>++</sup> oxidation (%)

Table 5. Effect of peptone.

Peptone %(w/v)	0.00	0.025	0.05	0.10	0.13	0.16	0.20
Final pH	2.20	1.91	2.00	1.98	1.91	1.95	2.63
Rate of Fe <sup>++</sup> oxidation (%)	85.0	100	98.6	97.8	97.0	96.8	3.8
Cell growth (O.D. at 470 mμ)	0.029	0.137	0.137	0.149	0.149	0.167	0.009

Table 6. Effect of nitrogen and energy source.

Exp. No.	I	II	III	IV	V
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	+*	+	—**	—	+
Peptone	+	+	+	+	—
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	+	—	+	—	+
Final pH	1.89	2.60	1.91	2.65	1.90
Rate of Fe <sup>++</sup> oxidation (%)	99.4		99.4		100
Cell growth (O.D. at 470 mμ)	0.184	0.000	0.143	0.000	0.134

\* contained in the medium

\*\* not contained in the medium

有無を表わしており, 硫酸アンモニウム, 硫酸第一鉄は9K培地におけるのと同量, ペプトンは0.05%添加した。Table 6. よりエネルギー源である硫酸第一鉄が存在しないと菌は生育せず(II, IV), ペプトンはエネルギー源としては利用され得ず, 菌生育には必ず無機エネルギー源が必要であること, 窒素源としては硫酸アンモニウムの他に有機物であるペプトンが良好であること(III), また最適窒素範囲内の硫酸アンモニウム存在下において<sup>9)</sup>, さらにペプトンを加えることにより, 最大の菌生育がもたらされることから(I), ペプトンは無機エネルギー源の存在下で炭素源としても利用されうることが考えられた。

### 総 括

鉄酸化細菌 WU-66B 菌 (*Thiobacillus ferrooxidans* とされる) の生育, 鉄酸化能などに及ぼす有機源の影響を検討した。

- 1) グルコースは0.2%までは有効に資化したが, それ以上の濃度となると, 菌生育, 鉄酸化をほとんど完全に阻害した。グルコース添加培地では培養初期に生育, 鉄酸化が遅延した。
- 2) 麦芽エキスは0.15%までは有効に資化したが, やはり培養初期に生育, 鉄酸化の遅延が起った。
- 3) 無機窒素源である硫酸アンモニウムの他に, 有機窒素源であるペプトンや尿素を資化した。ペプトンでは硫酸アンモニウムよりも良好な生育がみられたが,

単位菌量当りの鉄酸化能は減少し, また炭素源としても利用され得ることが推定された。しかし, 無機のエネルギー源が生育には必ず必要であった。尿素は窒素源として用いた場合, 硫酸アンモニウムに比べて菌生育, 鉄酸化能が共に低下した。

本研究の終りに供試菌と比較のために菌標本を分与いただいた財団法人醸酵研究所に厚くお礼申し上げます。

### 文 献

- 1) 伊藤: 本誌, **46**, 325 (1968).
- 2) Borichewski, R. M., Umbreit, W. W.: *Arch. Biochem. Biophys.*, **116**, 97, (1966).
- 3) Shafia, F., Wilkinson, R. F.: *J. Bacteriol.*, **97**, 256, (1969).
- 4) Anderson, K. J., Lundgren, D. G.: *Can. J. Microbiol.*, **15**, 73, (1969).
- 5) 宇佐美, 弓本: 水処理技術, **11**, 17, (1970).
- 6) 八木: 大坂市水道局水質試験所報告, 第12集, 82, (1961).
- 7) 渡辺, 内田, 古谷: 醸協, **25**, 431, (1967).
- 8) 寺井, 岩崎: 本誌, **49**, 53, (1971).
- 9) Breed, R. S., et al.: *Bergey's manual of Determinative Bacteriology*, 7th ed., 83, Williams & Wilkins Co., Baltimore (1957).

(昭46.3.29受付)