鉄イオンによる *Acidiphilium* 属細菌の Co²⁺耐性の増加*

資 徳 献¹ 稲 垣 賢 二² 杉 尾 剛³
岸 本 憲 明⁴ 田 野 達 男⁵

[UDC 669.253;663.18]

Improvement of Co²⁺-Resistance of Genus *Acidiphilium* on the Presence of Iron-Ion

by Dexian DOU¹, Kenji INAGAKI², Tsuyoshi SUGIO³, Noriaki KISHIMOTO⁴ and Tatsuo TANO⁵

Strains of *Acidiphilium* sp. resistant to four heavy metals, such as 10 mM Co²⁺, 100 mM Ni²⁺, 10 mM Cd²⁺, and 0.01 mM Hg²⁺, were obtained. An addition of ferrous or ferric ions in culture medium of *Acidiphilium* sp. markedly increased Co²⁺-resistance of the cells. The mechanism of Co²⁺-resistance was studied with *Acidiphilium* sp.35. Cobaltous ion (50 mM) inhibited uptake of ¹⁴C-glucose into intact cells and the activity of glucose oxidation. The activity of glucose oxidation was restored by adding ferrous or ferric ions (4 mM) in the reaction mixture, but ¹⁴C-glucose uptake activity was not. Ferrous or ferric ions strongly inhibited an accumulation of Co²⁺ in the strain, suggesting that inhibition of Co²⁺ uptake by ferrous and ferric ions is responsible for the improvement of Co²⁺-resistance by those ions.

1 ~ 3, 5. Faculty of Agriculture, Okayama University.

1. Graduate Student

2. Research Assoc., Dr.

3. Assoc. Prof., Dr.

5. Prof., Dr.

4. Assoc. Prof., Mimasaka Women's Junior College

1. 序 論

Thiobacillus 属細菌は微生物による湿式冶金、いわゆるバクテリアリーチングに使用されている重要な細菌である。これらの細菌は培養液中にピルビン酸をはじめ種々の有機物を放出し、このピルビン酸により生育阻害を受けていることが報告されている^{1)~3)}。またその他の有機物による生育阻害も認められている。長期間の培養中に生育阻害物質が蓄積し、菌数が減少するが、この間阻害物質も分解され、再び菌数が増加すると考える。そこで、培養液中に蓄積する有機物を取り除くことができれば、*Thiobacillus* 属細菌の生育を増加させ、バクテリアリーチングの効率を向上せしめることが可能と考えられる。一方、好酸性従属栄養細菌である *Acidiphilium* 属細菌は比較的貧栄養の環境でよく生育し、しかも *Thiobacillus* 属細菌と多くの点で生理学的性質に類似点が認められ、両菌の混合培養系をつくることも可能と考えられる。そこで、*Acidiphilium* 属細菌をバクテリアリーチングの混合培養系に用いるために、この菌の重金属耐性について検討したので報告する。

2. 実験方法

2・1 供試菌株

Acidiphilium organovorum は American Type Culture Collection (ATCC) から取り寄せた⁴⁾。*Acidiphilium* 属細菌は前回報告したように鉱山排水、下水道および土壌から分離したものをを用いた⁵⁾。

2・2 培地の調製

Acidiphilium 属細菌の培養には Harrison の GYE 培地⁶⁾を用いた。培地の組成は 1 リットル当たり g glucose 1.0 g, trypticase soy broth 0.1 g, (NH₄)₂SO₄ 3.0 g, K₂SO₄ 0.1 g, K₂HPO₄ 0.1 g および MgSO₄ · 7 H₂O 0.5 g である。培地の調製はまず無機塩と trypticase soy broth を脱イオン水に溶かし、2N H₂SO₄ で pH 3.0 に合わせた後、高圧滅菌 (121℃, 20 分間) し、これに別に高圧滅菌した 10% g glucose 溶液を添加した。重金属を含む培地を作る場合には、あらかじめ 0.2 μm メンブランフィルタで除菌した 1M CoCl₂, NiCl₂ および CdCl₂, 1mM の HgCl₂ 溶液を調製し、これを無菌的に培地に添加した。二価鉄イオンとしては FeSO₄ を使用し、三価鉄イオンとしてはクエン酸鉄を使用した。培養は 30℃ で行なった。

2・3 ¹⁴C-glucose の取り込み

25 mM β-アラニン-硫酸バッファー (pH 3.0) 0.8 ml に 10 μg 蛋白相当の intact cell (25 mM pH 3.0 の β-アラニン-硫酸バッファーで 3 回洗浄) を懸濁し、0.1 ml の脱イオン水あるいは重

* 1988 年 9 月 2 日受付 12 月 28 日受理

1. 岡山大学大学院博士課程学生 農学部

2. 農博 岡山大学助手 農学部総合農業科学科

3. 農博 岡山大学助教授 農学部総合農業科学科

4. 美作女子大学助教授

5. 正会員 農博 岡山大学教授 農学部総合農業科学科

金属溶液を加えて30℃, 15分間あらかじめインキュベートした。次に2 μ Ci (6 μ mol) 14 C-glucose 溶液 0.1 ml を添加した。1分後に0.1 ml を取り出して, 0.2 μ m メンブランフィルタで吸引濾過し, あらかじめ水で冷やした0.1 M のトリス-塩酸バッファー (pH 7.5) 10 ml で3回洗浄した。フィルタを4 ml の scintillant PCS に溶かして Aloka-LSC-635 型 Liquid-Scintillation System でカウントした。

2・4 Glucose 酸化活性の測定

検圧法で intact cell による酸素の消費を測定した。3 ml の pH 3.0 の培地 (glucose と trypticase soy broth を含まない) に 5 mg 蛋白相当の intact cell (上記培地で3回洗浄) を懸濁し, 0.3 ml の脱イオン水あるいは重金属溶液を加えて15分間インキュベートした。次に10% glucose 溶液 0.1 ml を添加して, 酸素の消費量を測定した。

2・5 コバルトの定量分析

40 ml の培地 (glucose 450 mg, trypticase soy broth 50 mg 含む) に 225 mg 蛋白相当の intact cell を懸濁して30℃, 15分間インキュベートした。5 ml の脱イオン水または重金属溶液 (final conc. Co^{2+} 50 mM, Fe^{2+} 4 mM) を添加し, 2分と10分後に, そして10分おきに 2 ml ずつ取り出して集菌した。氷で冷やした培地 (無機塩のみ) で5回早く洗浄し, 2 ml の 1N HCl に懸濁した。150℃で蒸発させて450℃, 24時間灰化し, 以上の操作を2回繰り返した。灰化物を1 ml の 1N HCl に溶かし, Shimadzu AA-625-01 型原子吸光光度計を用いて, 3407 Å でコバルトを定量分析した。

3. 実験結果

3・1 *Acidiphilium* 属細菌からの重金属耐性株のスクリーニング

今回分離した *Acidiphilium* 属細菌の分離源には鉄イオンを含む場合が多かったため, GYE 培地に 4 mM FeSO_4 を加えて重金属耐性株をスクリーニングした。107株の *Acidiphilium* sp. について Ni^{2+} , Co^{2+} , Cd^{2+} および Hg^{2+} に対する耐性を調

Table 1 Metal ion resistant strains isolated from mine drainage, sewage and soil.

Conc. (mM)	Ni^{2+}	Co^{2+}	Cd^{2+}	Hg^{2+}	Conc. (mM)	Ni^{2+}	Co^{2+}	Cd^{2+}	Hg^{2+}
Strain	100	100	10	0.01	Strain	100	100	10	0.01
11	+			+	2H	+	+		
21	+			+	28H	+	+	+	+
32-1			+	+	29H	+		+	
32-2			+	+	31H	+	+		
34	+	+			32H	+	+		
35	+	+	+	+	33H	+	+		
39	+	+			43H	+	+		
46	+	+			44H	+	+		
61				+	45H	+	+		
117	+				55H	+	+		
119			+		58H	+	+		
124			+	+	59H	+	+		
130-1				+	73H	+	+		
152			+	+	74H	+			
152-1	+	+	+	+	75H	+	+		
152-2	+	+	+	+	16R				+
154			+		A		+		

The plates (pH 3, added 4 mM FeSO_4) were incubated at 30°C for 10 days. +, the colonies were formed.

Fig. 1 Effect of ferrous ion on Ni^{2+} or Co^{2+} resistance of *Acidiphilium* sp. The plates (pH3) were incubated at 30°C for 10 days.

べた。結果は表 1 に示したように, 4 mM FeSO_4 存在下で 100 mM Ni^{2+} あるいは Co^{2+} に耐性を示した株は, それぞれ 25 株と 18 株, 両者に耐性を示したものが 17 株得られた。10 mM Cd^{2+} と 0.01 mM Hg^{2+} の耐性株は, それぞれ 12 株あった。 Ni^{2+} , Co^{2+} , Cd^{2+} および Hg^{2+} のすべてに耐性を示すものも 2 株得られた。

3・2 *Acidiphilium* 属細菌の重金属耐性に及ぼす二価鉄と三価鉄の影響

重金属耐性株のスクリーニングは 4 mM FeSO_4 存在下で行なったが, Cd^{2+} と Hg^{2+} 耐性株は鉄無添加でも同様な耐性を示した。 Ni^{2+} 耐性株では *Acidiphilium organovororum* (ATCC 43141), 152-2, 31H の 3 株に鉄イオンの影響が認められたが, その他の耐性株では鉄の影響はほとんどなかった。しかし, Co^{2+} 耐性株は鉄無添加では, いずれも 10 mM しか耐性を示さなかった

Fig. 2 Effect of Co^{2+} and FeSO_4 on the growth of *Acidiphilium* sp. 35.

Fig. 3 Effect of Co^{2+} and $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ on the growth of *Acidiphilium* sp.35 (to dissolve $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$, the medium was adjusted to pH2.3 with 2N H_2SO_4).

が、4 mMの FeSO_4 を添加すると、すべての株で Co^{2+} 耐性の著しい増加が認められ、150 mM Co^{2+} 耐性を示すものが5株認められた(図1)。表1および図1から*Acidiphilium* sp.35は Ni^{2+} 、 Co^{2+} 、 Cd^{2+} 、 Hg^{2+} の四者に耐性を示し、 FeSO_4 の存在で Co^{2+} 耐性が最も大幅に増大したことがわかった。そこで、この株を用いて、さらに Co^{2+} 耐性と FeSO_4 の関係を検討した。GYE培地に5 mM Co^{2+} を加えた場合の生育は対照とほとんど変わらなかった。しかし、5~15 mMと Co^{2+} の濃度の増加に従って、lag phaseが長くなることがわかった。15 mM以上の Co^{2+} が存在すると生育は、ほとんど完全に阻害された(図2)。しかし、これらに4 mM FeSO_4 を添加するとlag phaseが認められなくなり、50 mM Co^{2+} を加えても生育にほとんど阻害が現れなかった。 FeSO_4 の代わりにクエン酸鉄を加えても同様な効果が認められた。さらに三価鉄の効果を確かめるために、 $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ を用いて同様な実験を行なった。三価鉄が二価鉄と同様に Co^{2+} による長い lag phaseの短縮と生育阻害を回復する効果をもつことが認められた(図3)。

Fig. 4 Effect of pH on the growth of *Acidiphilium* sp.35 (incubated for 7 days).

Fig. 5 Effect of FeSO_4 or ferric citrate on the growth of *Acidiphilium* sp.16R(A) and 35(B) (incubated for 7 days).

3.3 *Acidiphilium* 属細菌の生育に及ぼす二価鉄と三価鉄の影響

Acidiphilium sp. 35を用いて、pH 2.3~4.5における生育に及ぼす二価鉄、三価鉄と Co^{2+} の影響を調べた(図4)。*Acidiphilium* sp. 35はpH 3.0~4.0の間で良く生育するが、10 mMの Co^{2+} が存在するとpH 3.2以下では生育は対照とほとんど変わらなかったが、pH 3.5以上ではほとんど生育が認められなかった。しかし、これに4 mMの FeSO_4 を添加すると、pH 2.3~4.5の間で著しい生育促進効果があった。また Co^{2+} 耐性にクエン酸の添加効果がまったくないのに対して、4 mMのクエン酸鉄の添加では各pHで FeSO_4 と同様な効果を示した。また FeSO_4 は高いpHの領域で、そしてクエン酸鉄は低いpHの領域で特に強い生育促進効果が認められた。

Acidiphilium sp. 16Rと35の生育に対する二価鉄と三価鉄の濃度の影響を図5に示した。両者に対しては二価鉄も三価鉄

Fig. 6 Effect of Co^{2+} and FeSO_4 on the glucose-oxidation activity of *Acidiphilium* sp.35.

Table 2 Effect of Co^{2+} and FeSO_4 on the ^{14}C -glucose uptake in *Acidiphilium* sp.35 (1 mg protein, 0.2 μCi (0.6 μmol) ^{14}C -glucose).

Conc. of Co^{2+} (mM)	- FeSO_4	+ FeSO_4 4mM
0	2925 d/m	2321 d/m
5	2371	2298
10	1882	1808
25	1496	1343
50	986	841

も低濃度で著しい生育促進効果を示し、三価鉄の濃度を100 mMに増加させても生育に阻害が認められなかった。しかし、二価鉄の濃度が高くなると、16R株では強い生育阻害が現れるのに対して、35株では200 mMの高濃度でも生育阻害が起こらなかった。

3・4 鉄による*Acidiphilium* sp.35の Co^{2+} 耐性増加の機作

Acidiphilium sp.35はglucose, fructose, glycerolなどで生育することができ、これらの基質の種類により Co^{2+} による生育への影響に差があった。また*Acidiphilium* sp.35はpH 2.3~6.5で生育し、エネルギー転換もこのような酸性条件下で行われている⁷⁾。そこで、まず ^{14}C -glucoseの取り込みに対する Co^{2+} の影響を調べた(表2)。生育にほとんど影響を及ぼさない5 mM Co^{2+} の存在下では、 ^{14}C -glucoseの取り込みもほとんど影響はなかった。 Co^{2+} の増加に従って ^{14}C -glucoseの取り込みが阻害され、50 mM Co^{2+} の存在下では対照と比べて取り込みはほぼ30%に低下した。しかし、 FeSO_4 の添加でも Co^{2+} による ^{14}C -glucoseの取り込みの阻害の回復が見られず、 FeSO_4 の添加だけでも、 ^{14}C -glucoseの取り込みの促進は見られなかった。また三価鉄も ^{14}C -glucoseの取り込みには影響が認められなかった。

次にglucoseの酸化活性に及ぼす Co^{2+} の影響を検圧法で調べた(図6)。実験方法で述べたように、10 mg glucoseと5 mg 蛋白

Scheme 1 Fractionation of cells for determining the distribution of Co^{2+} in *Acidiphilium* sp.35. (1), cell wall, (2), soluble fraction, (3), membrane.

相当の intact cell における60分間の O_2 消費量はほぼ $60 \mu\text{l}$ であったが、50 mMの Co^{2+} 共存下では、 O_2 の消費はほとんど認められなかった。これに FeSO_4 4 mM添加すると、約20分間の誘導期を経て、速やかに O_2 の消費が回復し、60分後にはほぼ対照と同じぐらいになるほど激増した。また4 mM FeSO_4 だけを反応液に添加すると、 O_2 の消費が約50%増えた。また三価鉄も同様な効果を示した。

菌体への Co^{2+} の取り込みに対する FeSO_4 の効果を図7に示した。50 mM Co^{2+} の存在下では、初めの10分間に Co^{2+} が急速に菌体へ入り、40分後には約 4×10^{-4} mg Co^{2+} /mg 蛋白の濃度まで菌体へ Co^{2+} が入って、平衡状態に達した。しかし、4 mM FeSO_4 を添加すると菌体に入る Co^{2+} の量が60%近く減少した。また60分間後の菌体を直ちにスキーム1に示したように分画して、 Co^{2+} の定量分析を行なうと、 FeSO_4 の存在下では Co^{2+} がほとんど膜と細胞壁画分にとどまり、菌体の中に入らないことがわかった。三価鉄も同様な効果があった。

Fig. 7 Effect of FeSO_4 on the Co^{2+} uptake and the distribution of Co^{2+} in *Acidiphilium* sp.35.

4. 考 察

この研究で FeSO_4 の存在で *Acidiphilium* 属細菌の重金属耐性, 特に Co^{2+} 耐性が大幅に増加することがわかった (図 1)。また Co^{2+} による lag phase の伸びが FeSO_4 の添加によってなくなり, そして FeSO_4 の添加で生育が促進され, 定常期における菌体量が 2 倍ぐらいに増えた (図 2, 4)。また $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ とクエン酸鉄も同様な効果があることがわかった (図 3)。クエン酸による Co^{2+} 耐性の減少 (図 4) は Co^{2+} とクエン酸のキレート形式で菌体に入りやすくなったためと思われる。

今回スクリーニングした *Acidiphilium* sp. 35 は Ni^{2+} , Co^{2+} , Cd^{2+} と Hg^{2+} 耐性をもち, しかも高濃度の鉄イオン (二価鉄と三価鉄の両者) にも耐性を示した (表 1, 図 5)。また鉄イオンの存在で Co^{2+} 耐性が大幅に増加した (図 2)。これらの諸性質から, この株は現在高濃度の鉄イオンの存在環境下で行なわれているバクテリアリーチングの改善に, きわめて重要なものと考えられる。

Acidiphilium sp. 35 の ^{14}C -glucose の取り込みと glucose 酸化活性は Co^{2+} に阻害され, 鉄イオンの添加では, glucose 酸化活性だけが回復した (表 2, 図 6)。 Co^{2+} による ^{14}C -glucose の取り込みの阻害が鉄イオンの添加で回復されないにもか

かわらず, 菌の生育は対照とほとんど変わらなかった (表 2, 図 2)。また鉄イオンの存在下で, Co^{2+} が菌体内にほとんど入らないことがわかった (図 7 の可溶性画分の Co^{2+} の量を 3 回の実験のうちの最高値で示した。そのうちの 2 回はほとんど検出されなかった)。従って, 鉄イオンによる Co^{2+} 耐性の増加は鉄イオンが Co^{2+} に阻害される生体反応を活性化するのではなく, Co^{2+} が菌体内に進入することによるという可能性が高い。

今回分離した好酸性従属栄養細菌 107 株中に 100 mM の Ni^{2+} に対して, また 4 mM の FeSO_4 の存在下では 100~150 mM Co^{2+} に対して耐性を示す菌株が多数存在することがわかった。

参 考 文 献

- 1) Schnaitman, C. & Lundgren, D. G. : Can. J. Microbiol., 11, 23 (1965)
- 2) Borichewski, R. M. & Umbreit, W. W. : Arch. Biochem. Biophys., 116, 97 (1966)
- 3) Borichewski, R. M. : J. Bacteriol., 93, 597 (1967)
- 4) Lobos, J. H., Chisolm, T. E., Bopp, L. H. & Holmes, D. S. : Int. J. Syst. Bacteriol., 36, 139 (1986)
- 5) Kishimoto, N. & Tano, T. : J. Gen. Appl. Microbiol., 33, 11 (1987)
- 6) Harrison, A. P. Jr. : Int. J. Syst. Bacteriol., 31, 327 (1981)
- 7) 大門浩作・稲垣賢二・杉尾 剛・田野達男・岸本憲明 : 日本農芸化学会 1989 年度全国大会