■■■ 論文

鉄酸化細菌の増殖挙動の簡便測定法とその応用*

— ポリオキシエチレン化合物存在下での増殖挙動 —

広 吉 直 樹¹ 伊 藤 真 由 美²
恒 川 昌 美³ 平 島 剛⁴

Simple and Rapid Cell Growth Estimation Method for *Thiobacillus ferrooxidans* and the Growth Rate in the Presence of Polyoxyethylenes

by Naoki HIROYOSHI¹, Mayumi ITO¹, Masami TSUNEKAWA¹ and Tsuyoshi HIRAJIMA¹

1. Faculty of Engineering, Hokkaido University, Kita-ku, Sapporo 060

Conventional turbidity method can not be used to estimate the cell growth of *Thiobacillus ferrooxidans*, because ferric precipitates (ferric hydroxide and jarosites) are formed in the medium due to bacterial oxidation of ferrous ions. In this paper, a modified turbidity method is proposed and demonstrated. The microorganisms were grown in 9K medium and the culture medium was sampled periodically. The sample medium was mixed with equal volumes of 6N HCl to dissolve ferric precipitates. The precipitates dissolved completely after 30 minutes. The turbidity of the mixed solution was measured by nephelometer after the dissolution. During the culture, the turbidity increased exponentially, then reached a constant value, corresponding to exponential and stationary phases on the growth curve. The specific growth rate obtained from the turbidity curve agreed with the rate from the direct cell counting. The proposed method is more simple and rapid than the direct cell counting and protein assay that are usually used to estimate the cell growth of *Thiobacillus ferrooxidans*.

Using the modified turbidity method, the growth rates of *Thiobacillus ferrooxidans* in 9K medium containing 0 to 1,000 g/m³ of Tween20, Brij35, or polyethyleneglycol were investigated. With addition of 1,000 g/m³, all three polyoxyethylenes markedly suppressed the bacterial ferrous oxidation and cell growth.

KEY WORDS: *Thiobacillus ferrooxidans*, Growth Rate, Turbidity, Polyoxyethylenes

1. 結 言

代表的な鉄酸化細菌である *Thiobacillus ferrooxidans* の種々の条件下における増殖挙動を把握することは、バクテリアリーチング、鉱廃水処理等での同菌の積極的な活用を計る上で重要である。*T. ferrooxidans* の菌体量測定には、従来、直接計数法やタンパク質量測定法が用いられている。これらの方法は測定に手間と時間を要するため、調べたい因子の数が多い場合には、より簡便で迅速な方法が望まれる。大腸菌などの場合には、培養液中の菌体によって生じる濁りを測定する濁度法が簡便法として広く用いられている。しかし、鉄(Ⅱ)イオンを基質とした *T. ferrooxidans* の培養過程ではジャロサイト、水酸化鉄(Ⅲ)等の鉄沈殿が生成してくるため、濁度法を用いることができなかった。

そこで本研究では、培養液中の鉄沈殿を酸によって溶解した後に濁度を測定する方法(酸添加濁度法)を考案し、従来法(直接計数法、タンパク質量測定法)と比較検討した。また、バクテリアリーチングの浸出促進剤として期待されている数種のポリオキシエチレン化合物(Duncan ら, 1964; 広吉ら, 1994, 1995; Sandval ら, 1991)存在下での *T. ferrooxidans* の増殖挙動について酸添加濁度法を用いて調べ、本法の有用性を確かめた。

2. 供試菌株、培地および試薬

本研究に用いた微生物は、豊羽鉱山酸性坑内水から分離培養したもの(広吉ら, 1992)であり、*T. ferrooxidans* と考えられる。同菌の培養には、9K 培地(Silverman ら, 1967)あるいは、9K 培地に所定濃度のポリオキシエチレン化合物を添加したものを使用した。

ポリオキシエチレン化合物には、非イオン性界面活性剤としてポリオキシエチレンソルビタンモノラウレート(和光純薬、以下では Tween20 と記す)とポリオキシエチレンラウリルエーテル(和光純薬、以下では Brij35 と記す)を、また、ポリエチレングリコールとして PEG200, PEG2000, PEG20000(和光純薬、数字は平均分子量を表す)を用いた。他に用いた試薬は、いずれも市販の試薬特級である。

* 1995年11月16日受付 1996年1月24日受理 1995年度資源・素材学会春季大会にて一部発表

1. 正会員 北海道大学助手 工学部資源開発工学科

2. 学生会員 北海道大学大学院学生 資源開発工学専攻

3. 正会員 工博 北海道大学教授 工学部資源開発工学科

4. 正会員 工博 北海道大学助教授 工学部資源開発工学科

[著者連絡先] FAX 011-716-6175 (北大・資源)

キーワード: チオバシラス フェロオキシダンス, 増殖速度, 濁度法, ポリオキシエチレン化合物

3. 実験方法

3・1 培養方法および菌体懸濁液の調製方法

T. ferrooxidans は、既報に述べた方法（広吉ら，1992）で 9K 培地を用いて前培養し，集菌・洗浄の後，所定の組成の培地におよそ 1×10^7 cells/cm³ となるように懸濁して実験に供した。500 cm³ 三角フラスコにこの植菌した培地 165 cm³ を加え，フラスコ開口部にシリコ栓をした後，恒温回転振盪機を用いて 30℃，120 rpm の条件で振盪培養した。所定時間が経過するごとに培養液数 cm³ を採取し，3・2 に述べる方法で濁度，鉄(II)イオン濃度を測定した。一部の実験では，数本のフラスコで培養を行い，所定時間が経過するごとにフラスコ 1 本を振盪機から取り出して培養液を全量採取し，濁度，鉄(II)イオン濃度の他にタンパク質量，菌体数についても測定した。

また，比較のため，次の方法で調製した菌体懸濁液についても，3・2 の方法に従い濁度を測定した。上述のように 9K 培地で前培養後，集菌，洗浄した *T. ferrooxidans* を 0.01 mol/dm³ 硫酸に懸濁して菌体懸濁液原液とした。菌体懸濁液原液をさらに 0.01 mol/dm³ 硫酸で希釈して，種々の濃度の菌体を含む菌体懸濁液を調製した。なお，この際，菌体懸濁液原液を $1/n$ の濃度に薄めたとき，この菌体懸濁液の希釈率を n と表記する。

3・2 分析法

3・2・1 濁度 採取した培養液または菌体懸濁液 3 cm³ と 6N 塩酸 3 cm³ を試験管に採り，すばやく混和した後，石英ガラスセルに移して，この混合液の濁度（散乱光強度の透過光強度に対する比率）をボイック積分球式濁度計（日本精密工学，SEP-PT-201）で測定した。本濁度計では，JIS K0101 に従って調製した 1 g/m³ のカオリン懸濁液の濁りが 1 ppm として表示される。以下では便宜上，この基準による読みとり値を濁度（ppm）として表示した。なお，溶液中に硫酸鉄(III)，硫酸鉄(II)，ポリオキシエチレン化合物が存在しても測定に影響しないことは，予備実験により確認した。

3・2・2 タンパク質量 前記（3・1）のフラスコ中の培養液 100 cm³ を遠沈管に入れ，遠心分離（16,000 × g ，10 min）により菌体を沈降させた後，上澄み液を捨てた。ついで遠沈管に 1N 水酸化ナトリウム 5 cm³ を加え，攪拌して菌体を可溶化した後，イオン交換水 5 cm³ を添加した。その後，鉄沈殿を遠心分離（5,333 × g ，5 min）により沈降除去し，上澄みに含まれるタンパク質量を Lowry 法（日本生物工学会，1992）により測定した。

3・2・3 菌体数 少量の培養液をバクテリア計数盤に採り，600 倍の位相差顕微鏡下で菌体数を直接計数した。

3・2・4 鉄(II)イオン濃度 鉄(II)イオン濃度は，1-10 オルトフェナントロリン法により測定した。ポリオキシエチレン化合物が本測定に影響しないことは，予備実験により確認した。

3・3 酸素移動容量係数

内容量約 20 cm³ のガラス容器に，1,000 g/m³ の濃度のポリオキシエチレン化合物を含む無菌培地 7 cm³ とマグネチックスターラの攪拌子を入れた。ついで，この容器を密閉するため，ガス挿入管，ガス排出管および溶存酸素電極を挿入したゴム栓を容器開口部に，取り付け付けた。この際，電極は培地に浸漬し，ガス挿入管および排気管の先端は容器内培地上の気相部分に位置するようにした。ガス挿入管を培地に浸漬しなかったのは，界面活性剤を含む培地にガスを導入した際に生ずる気泡により気液界面積が増大するのを防ぐためである。なお，溶存酸素電極は，30℃ の空気飽和イオン交換水に浸漬したときの指示値が 100 % となるよう

にあらかじめ調整してある。容器を 30℃ に保った恒温槽中に置き，スターラにより培地を攪拌しながら，ガス挿入管より空気を送気し，電極の指示値が一定値 (C' [%]) になるのを待った。このときの指示値は飽和酸素濃度に対応するものである。次いで，送気ガスを窒素に替え，電極の指示値が 8 % 以下になるのを待ち，再び送気ガスを空気に替えて酸素濃度の経時変化を測定した。この測定結果から酸素移動容量係数 A を，次式より求めた。

$$\ln\left(\frac{C'-C}{C'-C_0}\right) = A \cdot t \quad \dots\dots\dots (1)$$

t は送気ガスを窒素から空気に切り替えてからの経過時間 [h]， C は時間 t の電極の指示値 [%]， C_0 は，送気を窒素から空気に切り替えたときの電極の指示値 [%] である。

4. 結果および考察

4・1 酸添加濁度法による *T. ferrooxidans* 増殖量の測定

鉄(II)イオンを基質とした *T. ferrooxidans* の培養過程では，*T. ferrooxidans* の作用により鉄(II)イオンが酸化され，鉄(III)イオンが生成してくる（式(2)）。この鉄(III)イオンが加水分解されることにより水酸化鉄，ジャロサイトなどの沈殿が形成される（式(3)，式(4)）。

式(4)中の A^+ は，培地中に含まれる NH_4^+ ， Na^+ ， K^+ などの一価陽イオンである。これらの沈殿を溶解するために用いる酸の種類および濃度について予備的に検討したところ，6N 塩酸が有効であった^{a)}。*T. ferrooxidans* を 9K 培地で培養し，所定時間ごとに採取した培養液 3 cm³ に 6N 塩酸 3 cm³ を添加した場合の濁度の経時変化を Fig. 1 に示す。図中の θ は，*T. ferrooxidans* の培養時間である。培養時間 52，75 および 100 h の場合，培養液中には多量の鉄沈殿が認められ，この沈殿が酸により溶解され

Fig. 1 Turbidity of the culture solutions mixed with 6N HCl as a function of time.
 θ : incubation time

a) 9K 培地で *T. ferrooxidans* を培養し，静止期に達した後，多量の鉄沈殿を含む培養液を採取し，この培養液 5 cm³ と酸 5 cm³ を試験管中で混和，攪拌した後，視察した。(1:5) 硫酸，60 % 過塩素酸，3N 塩酸を添加した場合，30 分を経過しても鉄沈殿が認められた。8 mol/dm³ リン酸を添加した場合，沈殿は急速に溶解したが，溶液の粘性が高く，攪拌時に生じた気泡が混合液中に長時間残留した。6N 塩酸を添加した場合，鉄沈殿は迅速に溶解し，気泡も残留しなかった。そこで，以降の実験では 6N 塩酸を用いることとした。

Fig. 2 Turbidity of the cell suspensions mixed with 6N HCl as a function of time.
n : dilution

Fig. 3 Relationship between $1/n$ and turbidity of the cell suspensions mixed with 6N HCl.
 $T(1)$, $T(10)$ and $T(30)$ indicate the turbidity measured at 1, 10 and 30 minutes after the mixing, respectively.
n : dilution

るため、酸添加直後に濁度が急激に減少し、それぞれ約 7, 17 および 25 min 以上経過すると濁度の減少が緩やかになった。また、培養時間の長いものほど、濁度の値は高くなる傾向を示した。培養時間 0~29 h の場合、培養液中に鉄沈殿は認められなかったが、濁度は時間の経過に伴い緩やかに低下した。これは、菌体自体によって生じる濁度が 6N 塩酸の添加により低下することに起因する。このことは次のような実験で確かめることができる。すなわち、良く洗浄した *T. ferrooxidans* を 0.01 mol/dm^3 の硫酸中に種々の希釈率で懸濁し、これに 6N 塩酸を添加して濁度の経時変化を調べた。この実験結果を Fig. 2 に示す。いずれの希釈率の場合も、濁度は時間の経過に従い低下した。なお、塩酸を添加しない場合には濁度の低下は認められなかった。Fig. 3 に、希釈率の逆数と酸添加後 1, 10, 30 min 経過した時点での濁度、すなわち $T(1)$, $T(10)$, $T(30)$ との関係を示す。希釈率 n の逆数は菌体量と比例するから、Fig. 3 の結果は濁度と菌体量が比例することを示すものであるが、その比例係数は酸添加後の経過時間とともに変化する。

以上に示したように、培養液に 6N 塩酸を添加した場合、1) 沈殿の溶解にある程度の時間が必要であり、2) 菌体自体によって生

Fig. 4 Changes in $T(30)$, protein concentration and cell number of the culture solutions with the incubation time.

Table 1 Comparison of specific growth rate (μ) and doubling time (t_d) of *T. ferrooxidans* using different methods.

method	μ [h^{-1}]	t_d [h]
Turbidity method	0.1154	6.00
Protein assay	0.0694	9.99
Direct counting	0.1022	6.78

じる濁度は時間とともに低下する。このため、酸添加後の濁度を菌体量の指標として用いる際には、酸添加後の経過時間に十分留意する必要がある。以下では、鉄沈殿の溶解に必要な時間を勘案して、酸添加後 30 min の濁度測定値 $T(30)$ を増殖挙動を把握するための指標として用いた。

Fig. 4 に、*T. ferrooxidans* を 9K 培地中で培養した場合の濁度 $T(30)$ 、タンパク質量、菌体数と培養時間との関係を一例として示す。一般に微生物を回分培養した場合、増殖曲線は、誘導期、対数増殖期、静止期の順に区分けできる。 $T(30)$ の値は誘導期なしに培養開始直後から指数的に増大し(対数増殖期)、24 h 以降はほぼ一定の値となった(静止期)。タンパク質量は、指数的に増加した後、20 h 以降はほぼ一定の値となった。菌体数は、培養開始直後には増加せず(誘導期)、6 h 以降、指数的に増加した。菌体数で表される増殖曲線で対数増殖期から静止期へと移行するのは 35 h 付近であり、 $T(30)$ やタンパク質量の場合と一致しない。このように、 $T(30)$ 、タンパク質量、菌体数で表される増殖曲線では、それぞれ誘導期の有無や対数増殖期から静止期に移行する時期に違いが見られる。菌の増殖過程では、分裂に先立って菌体の組成や大きさが変化する。濁度やタンパク質量の測定値は、菌体の数に加えて、個々の菌体の大きさや組成などにも依存する。これに対して、直接計数法による測定値は、菌体の大きさや組成には関係しない。このような測定原理の違いが、増殖曲線の差として現れたものと考えられる。Fig. 4 から求めた比増殖速度と世代交代時間を Table 1 に示す。なお比増殖速度(μ)は、対数増殖期において次式で定義される。

$$dX/d\theta = \mu X \quad \dots\dots\dots (5)$$

ここで、 X はタンパク質量、菌体数および濁度であり、 θ は培養時間である。世代交代時間(t_d)は、 μ を用いて次式から算出した。

$$t_d = (\ln 2)/\mu \quad \dots\dots\dots (6)$$

酸添加濁度法と直接計数法を用いて求めた比増殖速度、世代交代

時間は、ほぼ一致した。*T. ferrooxidans* の菌体量測定には、直接計数法、タンパク質量測定法が従来多用されているが、前者は熟練を要し個人差も大きく、後者は測定操作が煩雑で多量の培養液を必要とする。一方、本研究で提案した酸添加濁度法は、少量のサンプルで個人差なく測定でき、直接計数法、タンパク質量測定法と比較してより簡便であり、有用な方法の一つと考えられる。

4・2 *T. ferrooxidans* の増殖および鉄(Ⅱ)イオン酸化活性に及ぼすポリオキシエチレン化合物の影響

界面活性剤 Tween20 は、適切な添加濃度の下で黄銅鉱のバクテリアリーチングを促進する (Duncan ら, 1964; 広吉ら, 1994, 1995)。また, Brij35, PEG200, PEG2000, PEG20000 は、適切な条件下で、硫酸鉄(Ⅲ)による黄銅鉱の浸出を促進し、バクテリアリーチングの浸出促進剤としての使用が期待できる。(Sandval ら, 1991; 広吉ら, 1994)。ここでは、酸添加濁度法を用いて、これらの試薬が *T. ferrooxidans* の増殖速度、鉄(Ⅱ)イオン酸化活性に及ぼす影響について調べた。実験結果の一例として、9K 培地に Tween20 を種々の濃度で添加して培養したときの $T(30)$ および鉄(Ⅲ)イオン濃度の経時変化を、Fig. 5, 6 にそれぞれ示す。添加濃度が 0, 10 および 100 g/m³ の場合、 $T(30)$ の値は培養開始後しばらくすると指数関数的に増大し、一定値に達した。最終的に到達する $T(30)$ の値は添加濃度に依らないが、増殖速度は添加濃度の増大に伴いわずかに小さくなった。添加濃度 1,000 g/m³ の場合、 $T(30)$ の値は増加せず、増殖は認められ

Fig. 5 The effects of Tween20 addition on the cell growth of *T. ferrooxidans*.

Fig. 6 The effects of Tween20 addition on the ferrous oxidation ability of *T. ferrooxidans*.

なかった。なお、直接計数法による菌体数の測定結果からも、添加濃度の増大に伴う増殖速度の低下が確認できた。Fig. 6 中の鉄(Ⅲ)イオン濃度は、初期鉄(Ⅱ)イオン濃度から各測定時間における鉄(Ⅱ)イオン濃度を差し引いて算出したものである。鉄(Ⅲ)イオン濃度は、いずれの添加濃度の場合も指数関数的に増大したが、その勾配は添加濃度の増大に伴い小さくなった。以下では、この勾配を鉄(Ⅱ)イオン酸化速度 k とする。

Fig. 7 は、増殖速度に及ぼす各種ポリオキシエチレン化合物の添加濃度の影響を示したものである。同図の縦軸には、ポリオキシエチレン化合物を添加したときの比増殖速度 μ を、無添加のときの比増殖速度 μ_0 で除した値を示してある。Tween20, PEG2000, PEG20000 を添加した場合、添加濃度の増大に伴い増殖速度は低下し、1,000 g/m³ で増殖が認められなくなった。Brij35 は 10 g/m³ で増殖を抑制し、100 g/m³ 以上添加した場合には、増殖が認められなかった。PEG200 は、100 g/m³ 以下では増殖にほとんど影響を及ぼさないが、1,000 g/m³ では増殖を抑制した。

Fig. 8 に、*T. ferrooxidans* の鉄(Ⅱ)イオン酸化活性に及ぼす各種ポリオキシエチレン化合物の添加濃度の影響を示す。同図の縦軸には、ポリオキシエチレン化合物を添加したときの鉄酸化速度 k を無添加のときの鉄酸化速度 k_0 で除した値を示してある。Tween20, Brij35 は、添加濃度の増大に伴い鉄(Ⅱ)イオンの酸化を抑制し、それぞれ 1,000 g/m³, 100 g/m³ で鉄(Ⅱ)イオン酸化を顕著に抑制した。PEG200, PEG2000, PEG20000 は、100 g/m³ 以下の添加濃度では鉄(Ⅱ)イオン酸化をほとんど妨げないが、1,000 g/m³ では鉄(Ⅱ)イオンの酸化を強く抑制した。

Fig. 7 The effects of polyoxyethylenes addition on the specific growth rate of *T. ferrooxidans*. The μ and μ_0 are the specific growth rates with and without polyoxyethylenes, respectively.

Fig. 8 The effects of polyoxyethylenes addition on the ferrous ion oxidation rate. The k and k_0 are the ferrous ion oxidation rates with and without polyoxyethylenes, respectively.

Table 2 Volumetric coefficient of mass transfer of oxygen (A) in the presence and absence of polyoxyethylenes.

polyoxyethylenes (1,000 g/m ³)	A [h ⁻¹]
No addition	4.96
Tween 20	5.41
Brij 35	6.64
PEG 200	6.19
PEG 2000	5.74
PEG 20000	5.27

培地中に界面活性剤等を添加すると、気相から液相への酸素の移動速度が低下して微生物による基質酸化、増殖が抑制されることがある（山根，1989）。しかし、Table 2 に示すように、本研究で使用したポリオキシエチレン化合物はいずれも酸素移動係数をわずかに増大させており、気液界面での酸素移動が鉄(II)イオン酸化を律速するとは考えられない。高濃度のポリオキシエチレン化合物が *T. ferrooxidans* の増殖と鉄(II)イオン酸化活性を抑制するのは、これらの化合物が細胞周縁部へ吸着し、細胞膜内酵素系や基質の細胞膜透過などに影響を与えることによるものと推察される。

5. 結 言

鉄(II)イオンを基質とした *T. ferrooxidans* の培養過程では、鉄沈殿が生成してくるため、菌体量測定に濁度法を用いることができず、従来、直接計数法やタンパク質量測定法を用いてきた。本報では、より簡便に増殖挙動を把握するため、培養液中の鉄沈殿を酸により溶解した後に濁度を測定する方法（酸添加濁度法）

を考案し、基礎的な事項について検討した。

T. ferrooxidans を 9K 培地で培養し、所定時間ごとに採取した培養液 3 ml に同容の 6N 塩酸を添加すると、30 min 以内に培養液中の鉄沈殿は溶解した。酸添加 30 min 後の濁度 $T(30)$ は、培養時間の経過に伴い指数関数的に増大した後、やがて一定値となり、増殖曲線に対数増殖期、静止期が明瞭に認められた。酸添加濁度法と直接計数法、タンパク質量測定法とを比較し、各測定法の特徴を明らかにした。酸添加濁度法を用いて、Tween20, Brij 35, および分子量の異なる 3 種のポリエチレングリコールをそれぞれ含む 9K 培地中で、*T. ferrooxidans* の増殖挙動、鉄(II)イオン酸化活性を調べたところ、いずれの試薬も 1,000 g/m³ でその増殖と鉄(II)イオン酸化を著しく抑制した。

謝辞 本研究の一部は、文部省科学研究費補助金（試験研究(B)(2)－05555274）により行われた。ここに記して謝意を表す。

引 用 文 献

- Duncan, D. W., Trussell, P. C. and Walden, C. C. (1964): Applied Microbiology, Vol. 12, p. 122-126
- 広吉直樹・恒川昌美・平島 剛・高森隆勝 (1992): 資源と素材, Vol. 108, p. 129-133
- 広吉直樹・中村 剛・恒川昌美・平島 剛 (1994): 資源・素材学会 1994 年度春季大会講演要旨集, p. 137-138
- 広吉直樹・中村 剛・恒川昌美・平島 剛・伊藤真由美 (1995): 資源と素材, Vol. 111, p. 943-948
- 日本生物工学会編 (1992): 生物学実験書, 培風館, p. 27-28
- Sandoval, S. P., Pool, D. L. and Scholtze, L. E. (1991): Rep. Invest. US Dep. Inter. Bur. Mine, No. 9381, p. 14
- Silverman, M. P. (1967): J. Bacteriol., Vol. 94, p. 1046-1051
- 山根恒夫 (1989): 生物反応工学, 産業図書株式会社, p. 197