

Thiobacillus thiooxidans による鉄酸化

田野達男・酒井清文・今野富士子・杉尾 剛・今井和民
(醸酵化学研究室)

Received July 1, 1976

Iron Oxidation by *Thiobacillus thiooxidans*

Tatsuo TANO, Kiyofumi SAKAI, Fujiko KONNO,
Tsuayoshi SUGIO and Kazutami IMAI
(Laboratory of Fermentation Chemistry)

The iron-oxidizing activity of *Thiobacillus thiooxidans* cultured in the ONM medium was very weak. When the bacteria were successively cultured in the 9K medium containing sulfur, whose content was decreased step by step, the activity of iron-oxidation adaptically increased to 25-fold as much as that of the non-acclimatized organism. However, this activity was only about 5% of that of *Thiobacillus ferrooxidans*.

The optimum pH value of the ferrous iron-oxidation of the acclimatized organism was very low. As the pH of the reaction mixtures was decreased down to 1.2, the activities gradually increased.

The non-acclimatized bacteria contained B-, C- and A-type cytochromes, but B-type cytochrome could not be detected in the acclimatized organism. When ferrous iron was added to the cell-free extracts of both bacteria, C- and A-type cytochromes were reduced, but the reduction of B-type cytochrome could not be observed.

The iron-oxidizing activity of the non-acclimatized bacteria was found in the particulate fraction. On the other hand, the activity of the acclimatized organism was found neither the particulate fraction, nor in the soluble fraction. However, the activity was recovered to the same level as the cell-free extracts when both fractions were combined.

From these results it is postulated that the iron-oxidizing system of acclimatized *T. thiooxidans* was modified to a system which is similar to those of *T. ferrooxidans*.

緒 言

Thiobacillus thiooxidans および *Thiobacillus ferrooxidans* は、それぞれおもに、 S^0 を SO_4^{2-} に、 Fe^{2+} を Fe^{3+} に酸化することによって生じるエネルギーを利用して生育する独立栄養細菌である。*T. ferrooxidans* は、 Fe^{2+} の他にイオウや無機イオウ化合物(チオ硫酸など)をも酸化しうることが知られている^{1,9,10,12,16,17)}。その際、生育にはかなりの適応期間が必要であることが、UNZ ら¹⁾ によって報告されている。また、MARGALITH ら¹⁰⁾ は、イオウで前培養することによりイオウ酸化活性が増大したことを示し、TUOVINEN ら¹⁶⁾ は、チオ硫酸で培養を続けると、次第に鉄酸化活性が低下してくることを報告している。

一方、*T. thiooxidans* にも鉄酸化活性が僅かに存在するが、それに関する報告はほとんどみられない。そこで、逆に *T. thiooxidans* は多量の鉄存在下で生育できるのか、またそれには適応期間が必要なのか、もし生育可能ならば、鉄の酸化活性を適応的に著しく増加

させたとき、その酸化によるエネルギーは生育に利用できるようになるのか等の問題は、この *Thiobacillus* 属の菌の相互の関係を知る上に、きわめて興味深いことである。本報では、これらの点について、いくらかの検討を加えてみた結果について報告する。

実 験 方 法

1. 供試菌株

Thiobacillus thiooxidans strain ON 106⁵⁾ を本研究に用いた。

2. 培地および培養方法

本菌株の基本培地として、ONM 培地⁶⁾ を用いた。組成は次の通りである：(NH₄)₂SO₄, 0.2 g；KH₂PO₄, 0.4 g；MgSO₄·7H₂O, 0.03 g；CaCl₂·2H₂O, 0.03 g；FeSO₄·7 H₂O, 0.001 g；S⁰, 1.0 g；脱塩水, 100 ml。

また、鉄に適応させる段階での菌の培養は、SILVERMAN & LUNDGREN による 9 K 培地¹³⁾ を用いた。組成は、(NH₄)₂SO₄, 0.3 g；K₂HPO₄, 0.05 g；MgSO₄·7 H₂O, 0.05 g；Ca (NO₃)₂, 0.001 g；10N H₂SO₄, 0.1 ml；脱塩水, 70 ml；14.74% FeSO₄·7H₂O, 30 ml であり、pH は 3.0 である。

生育実験は、100 ml 容坂口フラスコに培養液 90 ml をとり、蒸気殺菌を 30 分、3 日間行なった後、別に ONM 培地で振盪培養した種菌 10 ml を接種し、30°C で振盪培養を行なった。

洗浄菌体、無細胞抽出液および可溶性画分、顆粒画分の調製に用いた菌体は、10 ℓ 容のポリエチレン製の試薬ビンに、培地 8.1 ℓ、種菌 0.9 ℓ を加え、30°C で通気攪拌培養し、増殖率（培養 1 日目の値を 1 とする）が 10 前後となる対数増殖期の菌を、連続遠心分離（10,000×g）で集菌した後、蒸留水で 3 回洗浄して得た。

3. 菌体量の測定および Fe²⁺、SO₄²⁻ の定量

培養液の一定量を無菌的に採取し、東洋濾紙 No. 2 で濾過しイオウを除いた後、菌体量はトーマのヘマトメーターを用い、顕微鏡下で菌数を数えて測定した。また、570 nm の比濁度より乾燥菌体量に換算した。

Fe²⁺ および SO₄²⁻ は、それぞれ o-phenanthroline 法¹¹⁾、FRITZ & FRULAND の方法³⁾ により定量した。

4. コロイドイオウの調製

チオ硫酸ソーダを用い、KURTENACKER の方法⁸⁾ により調製した（濃度は 3 mg/ml）。

5. 可溶性画分と顆粒画分の調整^{14, 15)}

Fig. 1 に示したように処理し、無細胞抽出液を 100,000×g で 60 分遠沈したときの上清を可溶性画分、沈殿部分を 0.2 M Tris-SO₄²⁻ 緩衝液で 3 回洗浄したものを顆粒画分とした。

6. イオウおよび鉄酸化活性の測定

イオウ酸化活性および鉄酸化活性は、Warburg 検圧計を用いて、酸素の消費速度より測定した。

7. チトクロムのスペクトル測定

無細胞抽出液のチトクロム組成は、島津 MPS-50L 型自記分光光度計を用い、反射光測定法で測定した。

8. 蛋白質の定量

ウシ血清アルブミンを標準として、Biuret 法⁴⁾ により定量した。

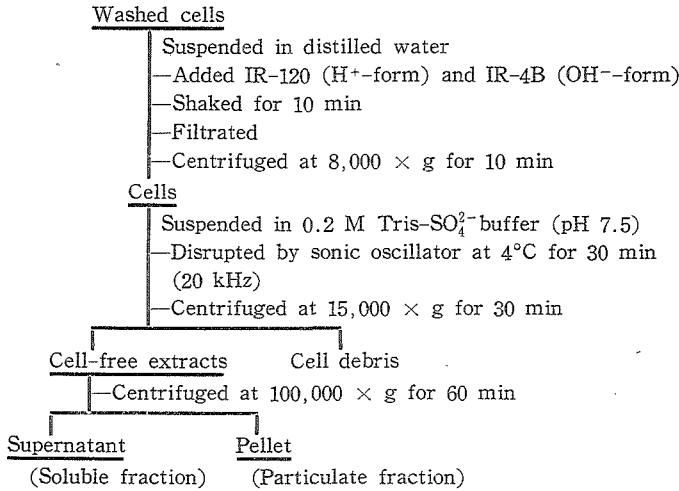


Fig. 1. Procedure for the preparation of soluble and particulate fractions.

実験結果と考察

1. 高濃度鉄含有培地における生育

T. thiooxidans は、通常 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ を 0.001% 含む ONM 培地で培養を続けているが、この菌を、硫酸第一鉄の濃度を 0.1% から 1% へと順次増加せしめた ONM 培地に植継いだ。その結果、硫酸第一鉄が 1% 含まれる場合でも、菌の生育、硫酸生成量とも対照と全く同様であり、影響は全く認められなかった。そこで、*T. ferrooxidans* を培養するための鉄を高濃度に含む 9K 培地 ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 5%) に、イオウを添加して培養した。このようにして充分鉄に適應せしめた後、9K 培地から順次イオウの含量を減じた培養液に植継いでいった。

Fig. 2 に各培養段階の対数増殖期中期における、菌体量と培地に加えた鉄およびイオウの酸化割合を示した。添加イオウは 0.6% の段階では生育の対数中期までにはほぼ 100% 酸化された。しかし、酸化イオウ量の点からみれば、減少したことになり、そのため菌体量も減少してきた。さらに、イオウ無添加の段階では、もはや菌の生育はまったく認められず、この菌はイオウのみをエネルギー源として利用し、鉄の酸化能が適応的に増加しても、その酸化エネルギーは生育に利用できないと考えられ

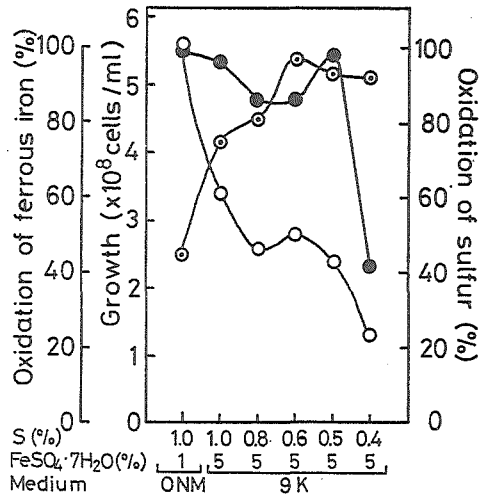


Fig. 2. Growth rate and the amounts of oxidized ferrous iron and sulfur by the middle of logarithmic phase in the various culture conditions.

The amounts of oxidized ferrous iron and sulfur are expressed as percentages of that added at the beginning.

- Growth
- Oxidation of ferrous iron
- ◎—◎ Oxidation of sulfur

る。一方、鉄酸化割合は添加イオウ0.4%の段階で著しい低下を示し、その後、菌体量とともに減少した。しかし、添加イオウ0.5%の段階までは、菌の生育が減少してきたにもかかわらず、鉄は85%以上酸化され、ほぼ一定であった。このことは、この菌の鉄の酸化能が適応的に増加したためと考えられる。

このように、硫酸第一鉄添加の影響が0.8%、0.6%イオウを含む段階の菌に現われてきており、鉄酸化活性の増大およびそれに伴う本菌の性質の変化が考えられた。

2. 鉄酸化活性およびイオウ酸化活性の変化

そこで、硫酸第一鉄への適応菌と非適応菌について、鉄酸化活性とイオウ酸化活性とを比較してみた。

鉄酸化活性は、Fig. 3 に示したように、*T. thiooxidans* [Fe-5, S-0.8] (0.8%イオウ添加9K培地で生育した菌)では非適応菌の約25倍に増加していた。しかし、*T. thiooxidans*の鉄酸化活性はきわめて低く、*T. ferrooxidans*の0.2%であり、25倍に増加したとしても、*T. ferrooxidans*のそれに比べれば鉄酸化能は非常に低い(比活性: $0.32 \mu\text{l O}_2\text{-uptake}/\text{min}/\text{mg cell}$)。一方、イオウ酸化活性は、Fig. 4 に示したように、*T. thiooxidans* [Fe-5, S-0.8]では非適応菌の73%、*T. thiooxidans* [Fe-5, S-0.6] (0.6%イオウ添加9K培地で生育した菌)では45%に低下した。このことは *T. ferrooxidans* をイオウに適応させると、イオウの酸化活性は増加するが、鉄の酸化活性が減少することと類似の性質であると思われる。

このように、硫酸第一鉄に適応させた菌は、 Fe^{2+} をエネルギー源にしないまでも、鉄酸化能の増大によってイオウ酸化能が低下したものと考えられ、電子伝達系の変化が示唆される

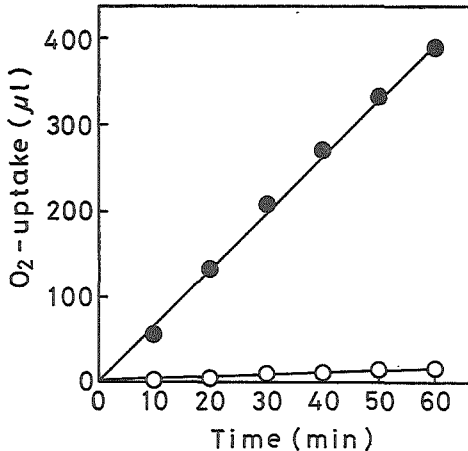


Fig. 3. Oxidation of ferrous iron by intact cells.

Each Warburg vessel contained 100 μmoles of $\beta\text{-alanine-SO}_4^{2-}$ buffer (pH 3.5), 100 μmoles of ferrous sulfate, 20 mg (dry weight) of intact cell and distilled water to make a total volume of 3.0 ml. The center well contained 0.2 ml of 20% KOH. Gas phase, air; temperature, 30°C.

○—○ *T. thiooxidans*
●—● Acclimatized *T. thiooxidans* (Fe-5, S-0.8)

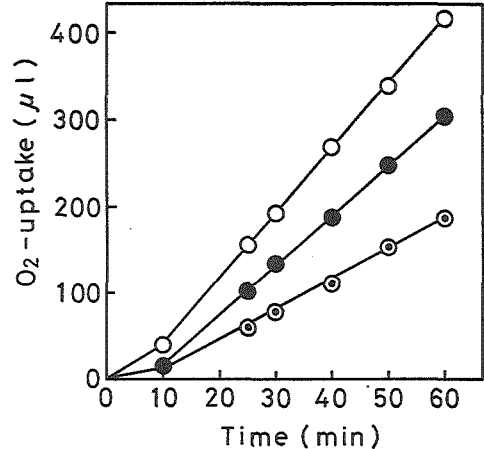


Fig. 4. Oxidation of sulfur by intact cells.

Each Warburg vessel contained 100 μmoles of $\beta\text{-alanine-SO}_4^{2-}$ buffer (pH 3.0), 3mg (1.0 ml) of colloidal sulfur, 1mg (dry weight) of intact cell and distilled water to make a total volume of 3.0 ml. The center well contained 0.2 ml of 20% KOH. Gas phase, air; temperature, 30°C.

○—○ *T. thiooxidans*
●—● Acclimatized *T. thiooxidans* (Fe-5, S-0.8)
○—○ Acclimatized *T. thiooxidans* (Fe-5, S-0.6)

ので、次に非適応菌、適応菌のチトクロム系について検討してみた。

3. チトクロム系の変化

非適応菌と適応菌の無細胞抽出液のチトクロム組成を Fig. 5 に示した。

非適応菌では (Fig. 5A), 553 nm に C 型, 560 nm に B 型, そして 609 nm に A 型のチトクロムの α 吸収帯が認められた。鉄に適応させた *T. thiooxidans* [Fe-5, S-0.8] では 552 nm および 523 nm に C 型の α, β 吸収帯, 595 nm に A 型のチトクロムの α 吸収帯が認められ, B 型チトクロムの量は著しく減少し, *T. ferrooxidans* のチトクロム系^{2,13)} に近いものになった。その結果, 鉄の酸化活性が増加し, 逆にイオウの酸化活性が減少してきたものと考えられる。

4. 各チトクロム類の鉄酸化への関与

そこで, これらのチトクロム系が, この菌における鉄の酸化とどのような関係にあるかについて検討してみた。

Fig. 6 に示したように, 非適応菌の無細胞抽出液のチトクロム類は, Fe^{2+} の添加により還元され, A 型および C 型チトクロムが, それぞれ 36.4%, 61.5% 還元されたのに反し, B 型チトクロムの還元は認められなかった。また, 鉄に適応させた *T. thiooxidans* [Fe-5, S-0.8] の場合は, Fig. 7 に示したように, 同様に Fe^{2+} によって C 型および A 型チトクロムの両者が還元され, この菌における鉄の酸化にも C 型と A 型チトクロムが関与し, B 型チトクロムには電子は渡らないものと思われる。

5. 鉄酸化活性におよぼす pH の影響

適応的に増加した *T. thiooxidans* の鉄酸

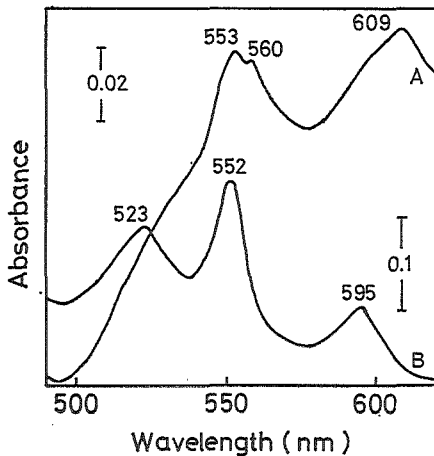


Fig. 5. Absorption spectra of cytochromes in the cell-free extracts from *T. thiooxidans* and acclimatized *T. thiooxidans* (Fe-5, S-0.8) reduced with $Na_2S_2O_4$.

- A) *T. thiooxidans*
- B) Acclimatized *T. thiooxidans* (Fe-5, S-0.8)

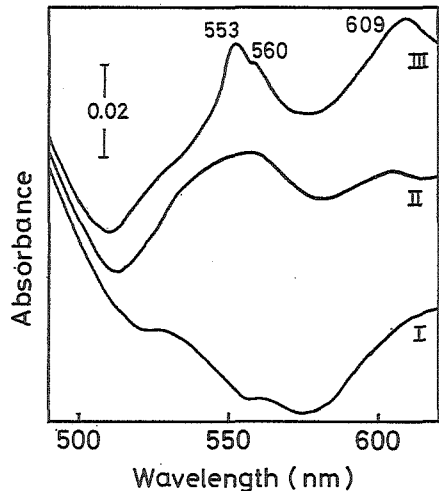


Fig. 6. Reduction of cytochromes during the oxidation of ferrous iron by *T. thiooxidans*.

The concentrations of KCN and ferrous iron were 5 μ moles and 100 μ moles, respectively. The cell-free extracts (96 mg of protein) dissolved in 0.2 M Tris- SO_4^{2-} buffer (pH 7.5) was previously oxidized with $KMnO_4$ and excess $KMnO_4$ was removed by a dialysis against the same buffer. After the terminal oxidation of cytochrome system was blocked by the addition of KCN, ferrous iron was added to the cell-free extracts.

- I) Cell-free extract + $KMnO_4$
- II) I + KCN
- III) II + Fe^{2+}

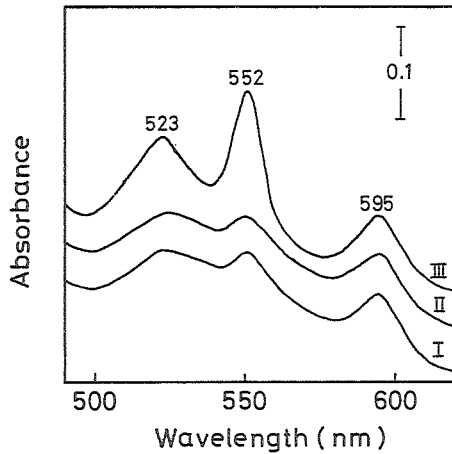


Fig. 7. Reduction of cytochromes during the oxidation of ferrous iron by acclimatized *T. thiooxidans* (Fe-5, S-0.8).

Experimental conditions were the same as in Fig. 6 except that the weight of protein was 50 mg.

- I) Cell-free extract+KMnO₄
- II) I+KCN
- III) II+Fe²⁺

化活性を, *T. ferrooxidans* のそれと比較してみた. この菌の鉄酸化の至適 pH は Fig. 8 に示した. 菌体および無細胞抽出液の両者とも,

pH が低くなるにつれて, 活性が高くなった. 至適 pH は, この菌の生育環境の pH とよく一致して極めて低く, *T. ferrooxidans* の pH 3.5 に比べ, より酸性側にあった. なお, 対照として 100°C, 10分間処理の菌体および無細胞抽出液を用いたが, それらによる鉄の酸化は認められなかったことから, このように低 pH における鉄の酸化も酵素的なものであると考えられる.

6. 鉄酸化系の存在部位

この菌の可溶性画分と顆粒画分それぞれの鉄酸化活性を調べた.

非適応菌の場合 (Fig. 9), 顆粒画分だけで無細胞抽出液のほぼ 100% に近い活性を示し, その活性は可溶性画分の 3 倍であった. また, 両者の混合による活性の増加は認められず, 鉄酸化に関与している成分は全て顆粒画分に存在し, 細胞膜に強固に結合しているものと考えられる. 可溶性画分にも活性が現われたのは, 超遠心画分において未分画の顆粒画分が混在していたためと思われる.

一方, 鉄に適応させた *T. thiooxidans* [Fe-5, S-0.8] の場合は, Fig. 10 のように, 可溶性画分あるいは顆粒画分のみではほとんど活性が認められず, 両者の混合によってはじめて活性が認められ, 無細胞抽出液と同程度の活性を示し, *T. ferrooxidans* の鉄酸化で認められている性質⁷⁾ と類似のものであった.

以上の結果より, 硫酸第一鉄適応菌 (*T. thiooxidans* [Fe-5, S-0.8]) の鉄酸化能の適応的増大は, *T. thiooxidans* のチトクロム系および鉄酸化系が, 最適 pH は *T. ferrooxidans*

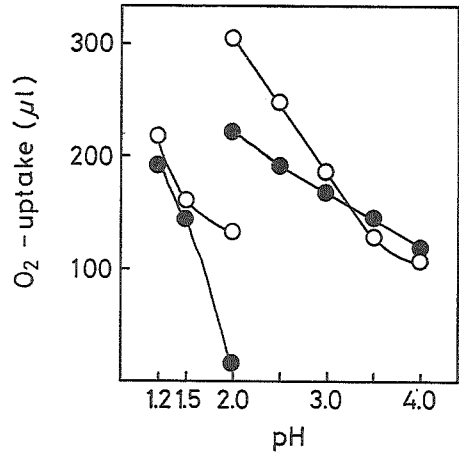


Fig. 8. Effect of pH on the oxidation of ferrous iron.

Each Warburg vessel contained 10 mg (dry weight) of intact cell or 20 mg protein of cell-free extract, 100 μ moles ferrous sulfate, 100 μ moles of the following buffer and distilled water to make a total volume of 3.0 ml: p-toluenesulfonate, pH 1.2~2.0; β -alanine-SO₄²⁻, pH 2.0~4.0. The center well contained 0.2 ml of 20% KOH. The reaction was carried out at 30°C for 60 min.

- Intact cell
- Cell-free extract

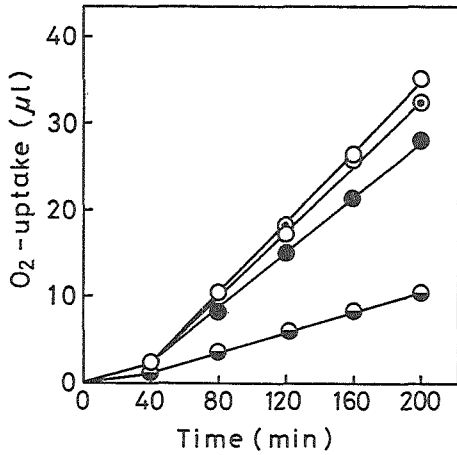


Fig. 9. Coupling effect of soluble and particulate fractions from *T. thiooxidans* on the oxidation of ferrous iron.

Each Warburg vessel contained 100 μ moles of β -alanine- SO_4^{2-} buffer (pH 2.0), 100 μ moles ferrous sulfate, each fraction and distilled water to make a total volume of 3.0 ml. The center well contained 0.2 ml of 20% KOH. Gas phase, air; temperature, 30°C.

- Cell-free extract (40 mg protein)
- ◐—◐ Soluble fraction (18 mg protein)
- ⊙—⊙ Particulate fraction (22 mg protein)
- Soluble fraction (18 mg protein)
+Particulate fraction (22 mg protein)

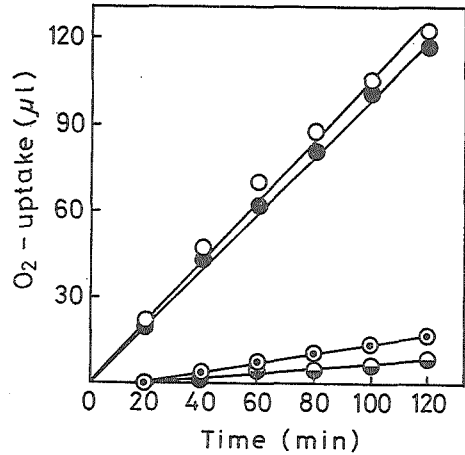


Fig. 10. Coupling effect of soluble and particulate fractions from acclimatized *T. thiooxidans* (Fe-5, S-0.8) on the oxidation of ferrous iron.

Experimental conditions were the same as in Fig. 9.

- Cell-free extract (31 mg protein)
- ◐—◐ Soluble fraction (12 mg protein)
- ⊙—⊙ Particulate fraction (19 mg protein)
- Soluble fraction (12 mg protein)
+Particulate fraction (19 mg protein)

のそれとは著しく異なるものの、*T. ferrooxidans* に認められる型へと適応的に増大したためではないかと考えられる。

摘 要

T. thiooxidans の鉄酸化について検討し、以下の結果を得た。

- 1) *T. thiooxidans* をイオウを含む9K培地で培養を続けると、添加イオウの減少に伴い菌体量も減少し、無添加の段階では生育は認められず、鉄の酸化エネルギーを生育に利用することはできなかった。しかし、添加イオウ0.5%の段階までは、鉄は85%以上酸化され、この菌の鉄酸化能の適応的増大がみられた。
- 2) 適応菌の鉄酸化活性は、非適応菌の25倍に増加したが、イオウ酸化活性は減少した。
- 3) 適応菌のチトクロム組成は、非適応菌のもの(B型、C型、A型チトクロム)とは異なり、C型とA型チトクロムのみであり、その両者が Fe^{3+} によって還元された。
- 4) 適応菌による鉄酸化の至適 pH は、この菌の生育環境の pH とよく一致し、1.2までは pH が低い程、活性が高かった。
- 5) 鉄酸化活性は、可溶性画分あるいは顆粒画分のみではほとんど認められず、両者の混合によってはじめて現われた。

終りにのぞみ、本研究に際しご協力をいただいた当研究室の方々に深謝いたします。

文 献

- 1) COLMER, A. R. : J. Bacteriol. **83**, 761—765 (1962)
- 2) DUGAN, P. R. and D. G. LUNDGREN : J. Bacteriol. **89**, 825—834 (1965)
- 3) FRITZ, I. and M. FRULAND : Anal. Chem. **26**, 1593—1595 (1954)
- 4) GORNALL, A. G., C. S. BARDAWILL and M. M. DAVID : J. Biol. Chem. **177**, 751—766 (1949)
- 5) 今井和民, 奥積昌世, 片桐英郎 : 醱工 **42**, 755—761 (1964)
- 6) 今井和民, 奥積昌世, 片桐英郎 : 醱工 **42**, 762—768 (1964)
- 7) 今井和民, 今野晴義 : 農化 **49**, 591—596 (1975)
- 8) KURTENACKER, A. : Analytische Chemie der Sauerstoffsäuren des Schwefels, Stuttgart (1938)
- 9) LANDESMAN, J., D. W. DUNCAN and C. C. WALDEN : Canad. J. Microbiol. **12**, 25—33 (1966)
- 10) MARGALITH, P., M. SILVER and D. G. LUNDGREN : J. Bacteriol. **92**, 1706—1709 (1966)
- 11) SANDELL, E. B. : Colorimetric determination of trace metals (2nd Ed.), 362, Interscience Publishers, Inc., New York (1950)
- 12) SILVER, M. : Canad. J. Microbiol. **16**, 845—849 (1970)
- 13) SILVERMAN, M. P. and D. G. LUNDGREN : J. Bacteriol. **77**, 642—647 (1959)
- 14) SUZUKI, I. and C. H. WERKMAN : Arch. Biochem. Biophys. **76**, 103—111 (1958)
- 15) SUZUKI, I. : Biochim. Biophys. Acta **104**, 359—371 (1965)
- 16) TUOVINEN, O. H. and D. P. KELLY : Arch. Microbiol. **98**, 351—364 (1974)
- 17) UNZ, R. F. and D. G. LUNDGREN : Soil Sci. **92**, 302—313 (1961)
- 18) VERNON, L. P., J. H. MANGUM, J. V. BECK and F. M. SHAAFIA : Arch. Biochem. Biophys. **88**, 227—231 (1960)

正 誤 表 (ERRATA)

頁	行 目	誤	正
32	下から7行目	(<u>35</u> 頭)	(<u>58</u> 頭)
34	Table 2. の中3ヶ所	DAINI-SENGAN (PR 23)	DAINI-SENGAN (PR <u>323</u>)
38	上から13行目	第三中 <u>尾</u>	第三中 <u>屋</u>
44	Fig. 4.	Body <u>y</u>	Body <u>y</u>
71	上から10行目	FeSO ₄ ·7 <u>H</u> O	FeSO ₄ ·7H ₂ <u>O</u>
73	上から17行目	Fe ⁺ <u>y</u>	Fe ²⁺ <u>y</u>
76	下から2行目	SHA <u>A</u> FIA	SHA <u>F</u> IA
77	下から8行目	W <u>r</u> er	w <u>e</u> re
78	Fig. 1.	em <u>e</u> rgance	em <u>e</u> rgence