HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Thiobacillus thiooxidansと共存するThiobacillus ferrooxidansの菌体数計数についての一考察 : メンブランフィルターを用いた選択培養法によるアプローチ
Author(s)	高森, 隆勝; 笹木, 圭子; 恒川, 昌美 他
Citation	北海道大學工學部研究報告, 154, 1-8
Issue Date	1991-01-31
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/42273
Type	departmental bulletin paper
File Information	154_1-8.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

北海道大学工学部研究報告
第154号（平成3年）

Bulletin of the Faculty of Engineering,
Hokkaido University, No. 154 (1991)

Thiobacillus thiooxidans と共存する *Thiobacillus ferrooxidans* の菌体数計数についての一考察
—メンブランフィルターを用いた選択培養法によるアプローチ—

高森　隆勝　　笹木　圭子
恒川　昌美　　平島　　剛

（平成2年10月29日受理）

A Study on the Method for Counting the Cell Number of *Thiobacillus ferrooxidans* in a Mixed Culture with *Thiobacillus thiooxidans*.
—by Selective Culture Using a Membrane Filter—

Takakatsu TAKAMORI, Keiko SASAKI,
Masami TSUNEKAWA and Tsuyoshi HIRAJIMA

(Received October 29, 1990)

Abstract

A method to estimate the cell number of *T. ferrooxidans* in a mixed cell of *T. ferrooxidans and T. thiooxidans* by means of the selective colony formation on a membrane filter was studied. It required 10 to 15 days for the formation of colonies. It was possible to count colony numbers when the colony formed from 1 ml of the sample is under 10^3. Using this method, it was clarified that the cell number of highly active *T. ferrooxidans* existing in the leachate of bacterial leaching or culture solution can be estimated.

1．まえがき

バクテリアを利用して，鉱石から金属成分を浸出し回収する技術であるバクテリアリーチングは，現在世界各国で注目されており，その操業条件の改善を目的とした基礎的研究が活発に行なわれている。バクテリアリーチングに最もよく利用されている細菌として，*Thiobacillus* 属の鉄酸化細菌（*Thiobacillus ferrooxidans*）とイオウ酸化細菌（*Thiobacillus thiooxidans*）を挙げることができる。これら2種の菌はともに好酸性で，比較的高濃度の金属イオンに耐性を示し，鉱山の酸性坑内水中などに生息していることが知られている。また前者は2価鉄イオンあるいは還元型イオウを酸化し，後者は還元型イオウを酸化してエネルギーを得ており，ともに二酸化炭素を同化しながら生育する化学独立栄養細菌である[1]。

前報[2]において著者らは，黄銅鉱のバクテリアリーチングは，*T. ferrooxidans* 単一菌で行なうよりも *T. ferrooxidans* と *T. thiooxidans* の混合菌で行なった方が効率的な銅イオンの浸出を達成することができることを示した（Fig. 1）。浸出過程における両菌の作用を解明し，浸出速度の改

資源開発工学科　鉱物処理工学講座

善と浸出効率の向上をはかるうえで，両菌の存在比率を把握することは重要である。しかし，通常用いられている直接計数法[*1]では2種以上の混合菌の場合，全菌体数を知ることにとどまり，各菌の菌体数をそれぞれ計数することはできない。そこで，次節に述べるメンブラン培養の方法により，*T. ferrooxidans* のコロニーを選択的に形成させ，そのコロニー数を計数し，菌体濃度を求める方法について検討を行なった。

2．メンブラン培養の方法

使用したメンブランフィルターはイモビロン－NC トランスファーメンブランフィルター(界面活性剤フリー) HATF04700(日本ミリポアリミテッド製)であり，これは製造工程において界面活性剤が使用されていないため菌の発育阻害がないこと，素材は細胞付着に適したセルロースであること，などの特徴を有するものである。

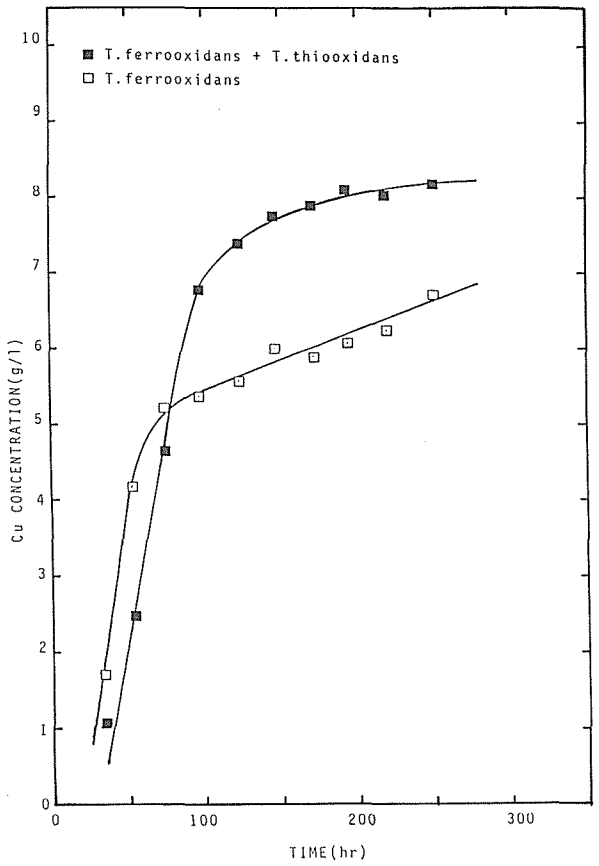

Fig. 1 Comparison of copper leaching by *T. ferrooxidans* and by the coexistence of *T. thiooxidans* with *T. ferrooxidans*.

[*1] 菌を含んだ試料水を適当に希釈し，既知容積のバクテリア計数板にとり，顕微鏡で観察しながら菌体数を直接カウントし，試料水中の菌体濃度を算出する方法。

Table 1 Culture medium for *T. ferrooxidans*

9K medium (g/l)	
basal solution	
$(NH_4)_2SO_4$	3.0
KCl	0.1
K_2HPO_4	0.5
$MgSO_4 7H_2O$	0.5
$Ca(NO_3)_2$	0.01
energy source	
$FeSO_4 7H_2O$	44.22
trace inorganic ions[*2]	
B, Mo, Zn, Mn	
pH 2.0	

本実験に用いた9K培地は，Table 1 に示すようにエネルギー源として2価鉄イオンを含む通常の9K培地の組成成分のほかに，生育促進のためにさらに微量の各種無機塩類を添加したものである。メンブラン培養の手順を以下に示す。希硫酸で pH2 に平衡化した吸収パット（アドバンテック東洋 M-085，1枚あたりの保持容量 1ml）をシャーレに置き，それに9K培地 1ml を浸潤させる。吸引濾過法でメンブランフィルター上に，菌体懸濁液 0.5ml を接種する。そのメンブランフィルターを吸収パットの上に置く。培養期間中メンブランフィルターが乾燥することを防ぐために，底に純水をはったデシケーターの中にシャーレをいれ，デシケーターごとインキュベーター（25°C）に入れて培養を行なうと，10～15日間でフィルターの上にコロニーが形成される。形成されたコロニーは以下に述べる方法[3]で染色した後，計数する。すなわち，1％酸性フクシン水溶液（使用時毎に濾過する）1.5ml を新たな吸収パットに含ませ，その上にコロニーを形成したメンブランフィルターを置き15分間染色する。つぎに，この染色したメンブランフィルターを新しい吸収パットの上に置き乾燥させた後，コロニー数をカウントする。以後，この方法による計数をコロニーカウント法と呼ぶ。

なお，メンブランフィルターに菌を接種する際に，フィルターの目を通過する菌の有無について確認するため，メンブランフィルターを二枚重ねて前述のように菌を接種し，二枚目のフィルターについても一枚目と同様に培養を行なった。いずれの実験においても，二枚目のフィルターにはコロニーの発現が全く認められなかったので，一枚目のフィルターを菌が通過する可能性はないものと判断される。

[*2] 微量無機塩類濃度（9K培地1ℓ中）：$Na_2B_4O_7 \cdot 10H_2O$ 0.1mg, $(NH_4)_2MoO_4$ 0.05mg, $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 10mg, $MnSO_4$ 10mg

3．実験および結果と考察

3.1 *T. ferrooxidans* 単一菌のメンブラン培養

実験に用いた菌は，豊羽鉱山坑内水を9 K培地に接種し，回分式液体振盪培養（培養温度：25°C）を行ない，培養過程の対数増殖期後期に培養液の一部を採取し，これを新鮮な培地に接種し再び同じ条件で培養を行ない（これを継代という），この継代をくりかえした後，シリカ平板培地[4]によって単離した菌（HUTY880801）[5]である。この菌を9 K培地に接種し液体振盪培養を行い，継代を数回繰り返した後，増殖過程のある時期に培養液の一部を採取し，これを新しい培地にて種々の希釈倍数*3になるように希釈し，それぞれをメンブラン培養の試料とした。希釈倍数の大きいものから順に吸引濾過法によってそれぞれ別のメンブランフィルター上に接種し，前述の方法により培養を行なった。培養日数の経過に伴い，菌体濃度（溶液1mlあたりの菌体数）の高いものから順に水酸化鉄によるメンブランフィルターの着色がみられ，またコロニーの形成が観察された。培養日数10日目以後はコロニー数の増加はほとんど認められなかったので，培養期間を13日間とした。

対数増殖期において採取したものについての結果をTable 2に示す。ここでは各希釈倍数の試料液につき3つの並列実験を行ない，その平均と標準偏差を表記した。Torma計数板による直接計数法では，1mlにつき10^6オーダー以下の菌体数の場合，再現性に乏しく計数が困難である。一方，メンブラン培養を行なったコロニーカウント法による菌体濃度は，10^3オーダーを越える場合，コロニー数が過密のため計数が不可能であった。単一の菌について，直接計数法による菌体数と，コロニーカウント法による菌体数との比を「コロニー形成率（colony forming activity）」と定義し，各希釈倍数の試料についてその値を求めた。コロニー形成率は希釈倍数の大きいところでより大きい値を示す傾向があるが，バラツキも大きくなった。この傾向をFig. 2に示す。この結果から，この場合の最適接種菌体濃度は10^3cells/ml程度であり，そのときのコロニー形成率は約0.21であった。

Table 2 The colony forming activity of *T. ferrooxidans* in the logarithmic phase

Dilution	Cell number by direct count (cells/ml)	Cell number by colony count (cells/ml)	Colony forming activity
1	$(8.04 \pm 0.68) \times 10^7$	C	-
10	-	C	-
10^2	-	C	-
10^3	-	C	-
10^4	-	$(1.4 \pm 0.6) \times 10^3$	0.17 ± 0.07
10^5	-	$(1.7 \pm 0.3) \times 10^2$	0.21 ± 0.04
10^6	-	$(1.7 \pm 1.0) \times 10$	0.22 ± 0.12
10^7	-	4.7 ± 1.1	0.58 ± 0.16

C = complicated, number of samples = 3

*3 菌を含んだ試料水1容に対し，無菌水9容加えた場合の希釈倍数は10である。

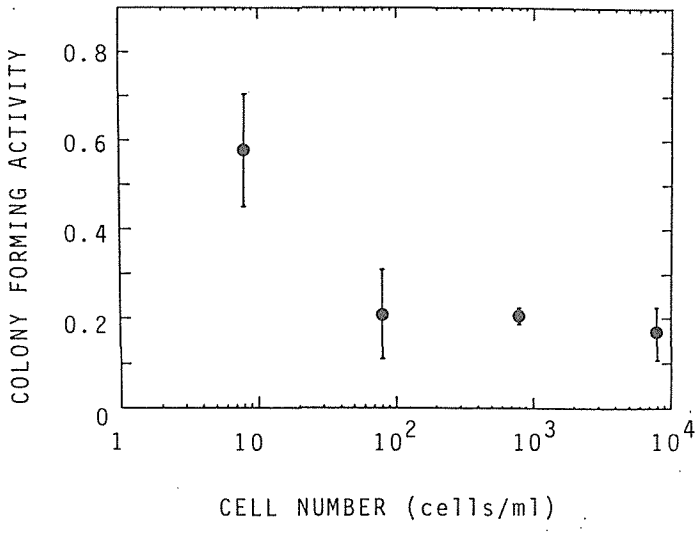

Fig. 2 Relationship between cell number and the colony forming activity of *T. ferrooxidans* in the logarithmic phase.
Cell number is calculated by using the results obtained from direct counting method and dilution.
(● : mean value, length of line : standard deviation, number of samples=3)

つぎに，対数増殖期を経過した時期に採取したものについて同様の実験を行なった。その結果を Table 3 に示す。Table 2 と同様に，コロニー形成率は希釈倍数の大きいところでより大きい値を示す傾向があるが，バラツキも大きくなった。しかし，本採取時期の菌体の場合は対数増殖期にある場合と比較して，コロニー形成率は同一の希釈倍数においてそれぞれ1/6～1/9に減少した。すなわち，コロニー形成率はその菌のもつ活性の程度に依存しており，対数増殖期においては活

Table 3 The colony forming activity of *T. ferrooxidans* after the logarithmic phase

Dilution	Cell number by direct count (cells/ml)	Cell number by colony count (cells/ml)	Colony forming activity
1	$(5.73 \pm 0.22) \times 10^8$	C	-
10	-	C	-
10^2	-	C	-
10^3	-	C	-
10^4	-	1.4×10^3	0.025
10^5	-	$(1.6 \pm 0.3) \times 10^2$	0.029 ± 0.006
10^6	-	$(1.5 \pm 0.3) \times 10$	0.026 ± 0.005
10^7	-	5.3 ± 4.1	0.093 ± 0.072

C = complicated, number of samples = 3

性の高い菌が多いためコロニー形成率が高いものと理解される。コロニーカウント法により，バクテリアリーチングにおける浸出過程で，活性の高い菌体の濃度を相互比較することが可能となる。

メンブラン培養における細菌の生育環境は，菌と培地との接触程度，湿潤状態，通気条件等においてきわめて厳しい制限を受けているので，1個の細胞がメンブランフィルター上で増殖し，1個のコロニーを形成することは容易ではないと考えられる。このことがコロニー形成までに長時間を要し，コロニー形成率を低下させる主要因と考えられる。

3.2 *T. thiooxidans* 優勢菌のメンブラン培養

実験に用いた菌は，豊羽鉱山坑内水をイオウ培地(Table 4 に示すように，Table 1 の 9 K培地成分中のエネルギー源である 2 価鉄を粉末イオウに置き代えたもの)に接種して回分式液体振盪培養(培養温度：25°C)を行ない，継代を繰り返すことにより，この培地に適合する菌を集積培養した菌であり，ほぼ *T. thiooxidans* であると推定される。この菌をイオウ培地に接種し，液体振盪培養を行ない，対数増殖期において培養液の一部を採取し，これを 9 K培地にて種々の希釈倍数に希釈し，それぞれについて前述の方法でメンブラン培養を行なった結果を Table 5 に示す。同表に示されている直接計数法による値は全菌体濃度を表わす。対数増殖期にある非常に活性が高い菌をメンブランフィルターに接種したにもかかわらず，9 K培地を用いてメンブラン培養を行なったところ，形成されたコロニー数は非常に少なかった。このことは，接種した菌は 9 K培地では生育できない *T. thiooxidans* から成っていることを示している。

Table 4 Culture medium for *T. thiooxidans*

Sulphur medium (g/l)	
basal solution	
$(NH_4)_2SO_4$	3.0
KCl	0.1
K_2HPO_4	0.5
$MgSO_4 7H_2O$	0.5
$Ca(NO_3)_2$	0.01
energy source	
sulphur	20.0
trace inorganic ions[*2]	
B, Mo, Zn, Mn	
pH 2.0	

Table 5 The count of trace cells of *T. ferrooxidans* in the enrichment culture of *T. thiooxidans*

Dilution	Cell number by direct count* (cells/ml)	Cell number by colony count (cells/ml)
10	8.75×10^6	46
10^2	-	42
10^3	-	34
10^4	-	8
10^5	-	0

*total cells

3.3 *T. ferroxidans* と *T. thiooxidans* の混合菌のメンブラン培養

3.1および3.2で述べた方法で，それぞれ9 K培地およびイオウ培地から対数増殖期に採取した *T. ferrooxidans* および *T. thiooxidans* を，両者の菌体濃度がともに2.10×10^8cells/ml となるように9 K培地で希釈し，これらを1:1で混合した。つぎに，この混合菌体懸濁液を9 K培地で種々の希釈倍数になるように希釈し，前述の方法でメンブラン培養を行なった。その結果を Table 6 に示す。同表中の直接計数法による菌体濃度は *T. ferrooxidans* だけの値を示したものである。希釈倍数とコロニー形成率およびそのバラツキとの関係は Fig. 3に示すように，*T. ferrooxidans* 単一菌の場合に得られた結果(Fig.2)と同様に，希釈倍数がより大きいところでコロニー形成率は大きくなるが，バラツキが著しくなるという傾向を示した。この場合の最適接種菌体濃度は10^2cells/ml 程度であり，そのときのコロニー形成率は約0.86であった。Table 6 および Fig. 3 に示されているコロニー形成率は，Table 2 および Fig. 2 に示されている値に比べてきわめて高く，このことは対数増殖期においても活性の高い菌体の割合が変化していることを示唆している。

Table 6 The colony forming activity of *T. ferrooxidans* in a mixed culture with *T. thiooxidans*

Dilution	Cell number by direct count (cells/ml)	Cell number by colony count (cells/ml)	Colony forming activity
1	$(1.05 \pm 0.0) \times 10^8$	C	-
10	-	C	-
10^2	-	C	-
10^3	-	C	-
10^4	-	$(4.7 \pm 0.4) \times 10^3$	0.44 ± 0.04
10^5	-	$(7.3 \pm 0.3) \times 10^2$	0.70 ± 0.04
10^6	-	$(8.9 \pm 1.0) \times 10$	0.86 ± 0.08
10^7	-	9.0 ± 2.5	0.86 ± 0.30

C = complicated, number of samples = 3

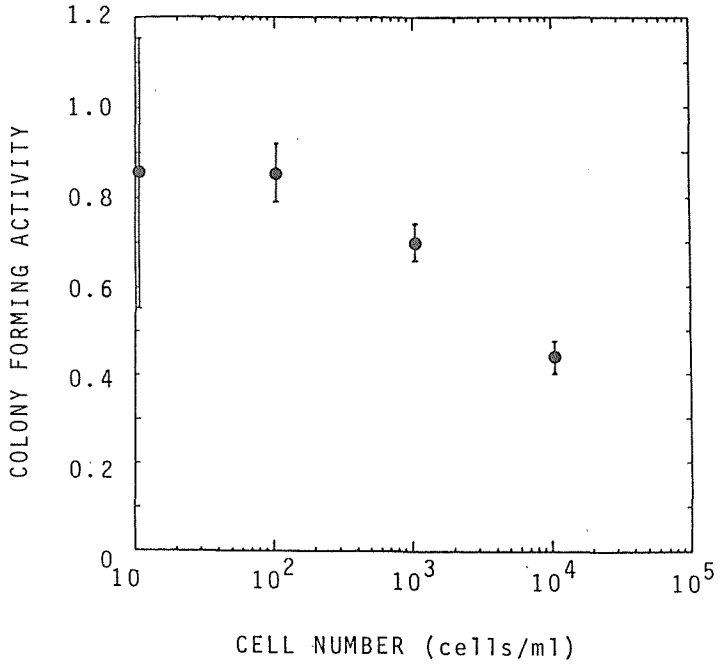

Fig. 3 Relationship between cell number and the colony forming activity of *T. ferrooxidans* in a mixed culture with *T. thiooxidans* in the logarithmic phase.
Cell number is calculated using the results obtained from direct counting method and dilution.
(●: mean value, length of line: standard deviation, number of samples=3)

4. まとめ

T. ferrooxidans と *T. thiooxidans* の混合菌について，メンブラン培養法による *T. ferrooxidans* の選択的培養を行なうことにより，*T. ferrooxidans* の菌体濃度を求める方法について検討を行なった。

その結果，コロニーの形成には10-15日間を要し，コロニー数の計数は試料液 1ml から形成されるコロニーの数が10^3 以下の場合に可能であった。また，*T. ferrooxidans* と *T. thiooxidans* の混合菌から *T. ferrooxidans* のコロニーを選択的に形成できることが確認された。コロニーカウント法では，活性の高い *T. ferrooxidans* の菌体がコロニーを形成すると考えられるため，本法により，バクテリアリーチングにおける浸出液，あるいは培養液中に存在する活性の高い *T. ferrooxidans* の菌体濃度の推定が可能であることを明らかにした。

参考文献

1) 今井和民：独立栄養細菌，(1984)，p. 63-90，化学同人.
2) 高森隆勝，山本琢也，笹木圭子，恒川昌美，平島 剛：資源・素材学会誌，**106**[10],(1990)，p. 611-616.
3) O. H. Tuovinen and D. P. Kelly: Arch. Microbiol., 88 (1973), p. 285-289.
4) 川原崎守，八木沢三男，山口宗男：微工研研報，**65** (1986)，p. 45-48.
5) 高森隆勝，笹木圭子，恒川昌美，平島 剛：資源・素材学会誌，**106**[4]，(1990)，p. 173-179.