

(14) 好酸性鉄酸化バクテリアの第一鉄酸化作用に関する研究

東北大学工学部 野 池 達 也
東北大学大学院 ○中 村 寛 治
九州大学工学部 海 田 輝 之
静岡県庁 近 藤 一 夫

1. はじめに

鉄酸化バクテリアは、 $\text{pH}1.0 \sim 4.0$ という強酸性条件下で、第1鉄を第2鉄に酸化する時に生ずるエネルギーを用いて、空気中の CO_2 を固定すると同時に、また、グルコースのような有機物も利用できる通性化学合成独立栄養細菌である。現在、鉄酸化バクテリアを用いて、強酸性含鉄鉱山排水中の第1鉄を第2鉄に酸化し、安価で、中和生成物の安定容積が小さい CaCO_3 により、中和処理する方法が行われている。鉄酸化バクテリアの増殖および生理学的特性については、従来数多くの研究が行われて来ているが、鉱山排水処理への応用面に関しては、まだ多くの検討すべき問題が残されている。

また、我国には、多くの酸性河川が存在し、多年にわたって水利用の価値を失い、農業、水産業および土木施設等の方面に被害をおよぼしてきている。一般に、酸性河川の上流には、硫化鉱物が存在する場合が多く、河川の酸性化の原因は、この硫化鉱物が酸化される結果生成される酸性鉱山排水が河川に流入するためと考えられる。さらに、硫化鉱物は、化学的に酸化されるのみならず、鉄酸化バクテリアの浸出作用によっても鉱山排水を生成することが知られている。

本研究では、(1)鉄酸化バクテリアの第1鉄酸化作用におよぼす水温、 pH およびグルコースの影響、(2)強酸性鉱山排水の形成における鉄酸化バクテリアの働き等の点について、岩手県旧松尾鉱山からの鉱山排水の流入する赤川（北上川2次支川）における現地調査、室内での回分実験および回転円板法による第1鉄の連続酸化実験によって検討を行った。

2. 第1鉄酸化作用におよぼす水温の影響

2-1 赤川における現地調査

2-1-1 調査方法

採水地点は図-1に示す通りで、鉱山排水が流入するやや上流の赤川源流から、中和処理場取水口入口まで10ヶ所とした。St.1からSt.10までの距離は3,250mであった。第1鉄および全鉄濃度は、それぞれ、現地と実験室で、JISK0102KMn

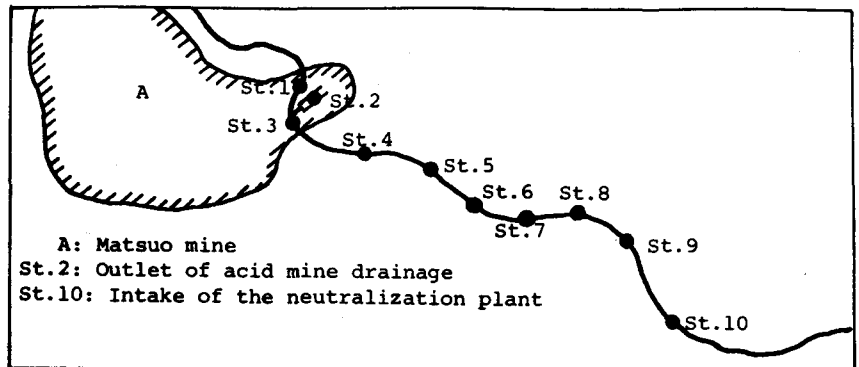


図-1 採水地点

O_2 法により、 pH は pH メーターにより測定した。調査はまた、次に示す3回にわたって行った。第1回：1977年9月30日、第2回：1977年11月7日、第3回：1978年11月29日。いずれの調査も晴天下に行われ、河川流量は定常的な値を示した。

2-1-2 調査結果および考察

調査結果を表-1～3に示す。3回にわたって行われた調査結果を比較すると、次式

表-1 第1回赤川水質調査結果(1977, 9. 30)

採水地点	水温 (°C)	pH	Fe ²⁺ (mg/ℓ)	全Fe (mg/ℓ)	酸化率 (%)
St. 1	19.4	2.86	240	500	
St. 2	18.8	1.85	563	667	
St. 3	18.4	1.90	511	541	0
St. 4	17.8	1.90	454	500	11.1
St. 5	18.2	1.98	352	500	31.1
St. 6	—	2.02	331	458	35.2
St. 7	18.5	2.10	289	450	43.4
St. 8	17.8	2.20	49	440	90.4
St. 9	17.8	2.24	42	440	91.8
St.10	17.5	2.20	14	425	97.3

表-2 第2回赤川水質調査結果(1977, 11. 7)

採水地点	水温 (°C)	pH	Fe ²⁺ (mg/ℓ)	全Fe (mg/ℓ)	酸化率 (%)
St. 1	8.6	2.55	255	510	
St. 2	—	1.46	584	839	
St. 3	16.5	1.50	557	730	0
St. 4	15.0	1.66	429	693	23.0
St. 5	14.2	1.68	374	620	32.9
St. 6	14.0	—	328	—	41.1
St. 7	13.3	1.74	265	584	52.4
St. 8	13.5	—	237	—	57.5
St. 9	13.5	1.82	210	584	62.3
St.10	13.5	1.90	34	510	93.9

表-3 第3回赤川水質調査結果(1978, 11. 29)

採水地点	水温 (°C)	pH	Fe ²⁺ (mg/ℓ)	全Fe (mg/ℓ)	酸化率 (%)
St. 1	5.3	2.62	370	469	
St. 2	18.2	1.89	618	618	
St. 3	15.4	1.97	539	583	0
St. 4	14.0	2.03	456	556	15.4
St. 5	11.8	2.12	354	442	34.3
St. 6	11.8	2.16	337	451	37.5
St. 7	11.2	2.18	285	442	47.1
St. 8	10.5	2.21	233	432	56.8
St. 9	9.3	2.30	99	393	81.6
St.10	9.2	2.31	79	390	85.3

表-4 1978年月別水質変化(値は平均)

月	St. 1 Fe ²⁺ (mg/ℓ)	St. 2 Fe ²⁺ (mg/ℓ)	St. 10 Fe ²⁺ (mg/ℓ)	St. 10 水温(°C)	St. 10 流量(m ³ /分)
1	343	632	192	4.6	34.2
2	311	626	169	4.7	31.0
3	286	614	154	6.1	30.5
4	346	627	162	3.6	68.7
5	125	711	143	8.8	102.3
6	178	718	96	15.3	70.2
7	225	683	7	18.7	45.5
8	226	639	97	18.2	46.3
9	241	613	72	14.7	36.2
10	305	604	51	10.6	33.0
11	383	593	135	5.7	33.3

$$\frac{[\text{Fe}^{2+}] \text{ St. 3} - [\text{Fe}^{2+}] \text{ St. 10}}{[\text{Fe}^{2+}] \text{ St. 3}} \times 100 \dots\dots\dots \textcircled{1}$$

で求められる St. 3 から St. 10 までの第1鉄酸化率は、第1回で97.3%、第2回で93.9%、第3回で85.3%となり、水温の低下に伴って低下していることが知られる。また、各点での流下時間と酸化率の関係を図-2に示した。これによれば、第1回(平均水温約18℃)

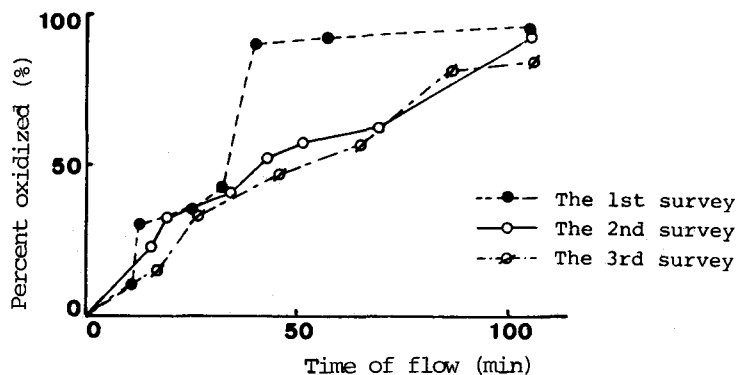


図-2 流下時間対第1鉄酸化率

の時の第1鉄酸化が、第2回(平均水温約14℃)および第3回(平均水温約12℃)の場合に比較し急速に進行しており、このことから鉄酸化バクテリアの第1鉄酸化作用は、15℃付近を境に急激に低下することが推察される。さらに、建設省岩手工事事務所の調査による水質資料より、第1鉄、全鉄、水温および流量について月平均値を求め、表-4に示した。これによれば水温が低下する1~5月および11月には、第1鉄濃度

は 135 ~ 192 mg/ℓ 、水温が上昇する 6 ~ 10 月には、7 ~ 97 mg/ℓ となり、水温が低下すると St. 10 での第 1 鉄濃度の上昇が示されている。以上のように、3 回の調査結果および表 - 4 から、赤川での鉄酸化バクテリアによる第 1 鉄酸化作用は、水温が低下すると共に低下し、その臨界温度が 15℃ 付近に存在することが知られた。

また、赤川の河床には粘質物が存在しているが、第 3 回の調査ではこの粘質物の性状に関しても調査を行った。まず、St. 4 で河川水に約 1/3 容量の粘質物を混入させたサンプルと混入させないサンプルを採取し、位相差顕微鏡により 600 倍下で、Thoma の血球計算盤を用いて細菌数を測定した。粘質物を混入させたサンプルでは、 4.27×10^7 個 / ml 、粘質物を混入させないサンプルでは、 4.58×10^5 個 / ml となった。また粘質物に付着する細菌の大部分が鉄酸化バクテリアであることを確認するために、粘質物混入のサンプルを静置して得られた上澄液 50 ml と、上澄液 28 ml に粘質物 22 ml を加えて 50 ml としたものとを、9 K 培地¹⁾ 450 ml に接種して振とう培養器により 30℃ で、回分実験を行った。結果を図 - 3 に示す。これによると、粘質物を混入したものは 3 日で酸化率が 100 % に達したが、混入しないものは、酸化率が 100 % に達するのに 5 日を要した。これらの実験結果から赤川に存在する粘質物には、多数の鉄酸化バクテリアが付着しており、これが河川での第 1 鉄酸化に大きな役割を果していることが明らかとなった。

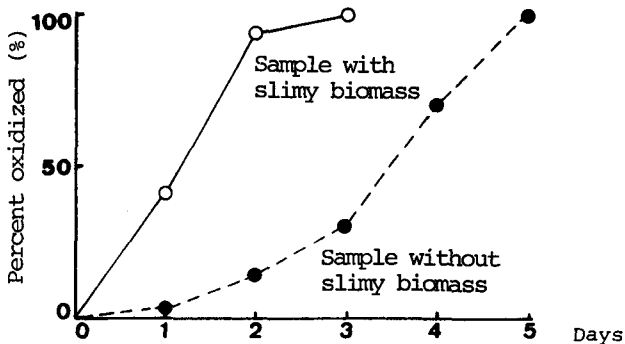


図 - 3 粘質物の影響

菌の大部分が鉄酸化バクテリアであることを確認するために、粘質物混入のサンプルを静置して得られた上澄液 50 ml と、上澄液 28 ml に粘質物 22 ml を加えて 50 ml としたものとを、9 K 培地¹⁾ 450 ml に接種して振とう培養器により 30℃ で、回分実験を行った。結果を図 - 3 に示す。これによると、粘質物を混入したものは 3 日で酸化率が 100 % に達したが、混入しないものは、酸化率が 100 % に達するのに 5 日を要した。これらの実験結果から赤川に存在する粘質物には、多数の鉄酸化バクテリアが付着しており、これが河川での第 1 鉄酸化に大きな役割を果していることが明らかとなった。

2 - 2 水温および pH の影響に関する室内実験

2 - 2 - 1 実験方法

実験に使用した鉄酸化バクテリアは、赤川から採取したもので、通気培養において、9 K 培地中の第 1 鉄が 50 mg/ℓ 以下になった時収集し、東洋ろ紙 No 1 によってろ過したもの 50 ml を表 - 5 に示す培地 500 ml に接種し平底フラスコ中に入れ、振とう培養器により振とう速度 80 回 / 分、振とう幅 3.5 cm の条件下で培養実験を行った。水温は 6 ~ 40℃ の範囲で 8 段階とし、各水温について初期 pH を 1.3 ~ 3.0 の範囲で 6 段階に変化させた。接種菌は各水温で 1 週間以上馴養した。分析項目は、第 1 鉄、pH および細菌数である。

2 - 2 - 2 実験結果および考察

表 - 5 基質組成

成 分	量
(NH ₄) ₂ SO ₄	3.0 g
KCl	0.1 g
K ₂ HPO ₄	0.5 g
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.5 g
Ca (NO ₃) ₂	0.01 g
蒸 留 水	700 ml
10NH ₂ SO ₄	適 宜
Fe SO ₄ · 7H ₂ O	15 % (w / v)
	溶 液 300 ml

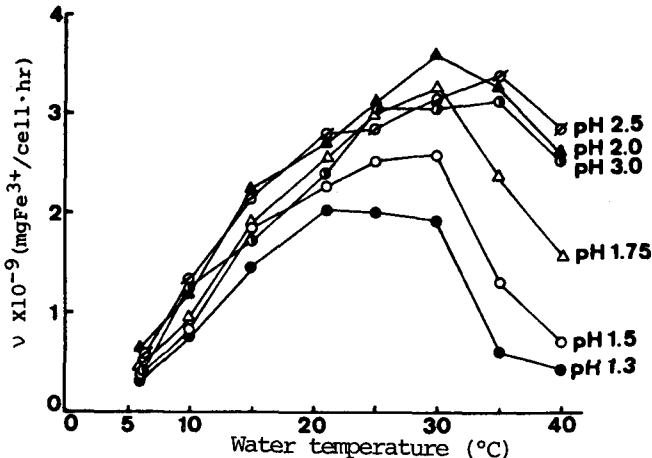


図 - 4 水温および pH の影響

結果を図 - 4 に示す。ただし、第 2 鉄の初期比生成速度 ν は次式によって求めた。

$$\nu = \frac{p}{X_0 \cdot t}$$

ν : Fe^{3+} 初期比生成速度 ($\text{mgFe}^{3+} / \text{個} \cdot \text{hr}$)、 p : 10 hr 後の Fe^{3+} 濃度 (mg/ℓ)。
 X_0 : 初期菌数 (個 / ml) t : 時間 (hr)。

6℃を除いて $t = 10 \text{ hr}$ とし、6℃では $t = 11 \text{ hr}$ とした。この図から鉄酸化バクテリアの第1鉄酸化活性は低温ではpHよりも水温の影響が大きく、高温では温度よりpHの影響が大きいことが知られた。また、至適水温はpHに依存し、低pHでは低く、pHの上昇につれて高くなることが知られた。最大初期比生成速度は、30℃、pH 2.0の時 $3.6 \times 10^{-9} \text{ mg/個} \cdot \text{hr}$ であった。

2-3 回転円板法による室内実験

2-3-1 実験方法

実験に用いた回転円板装置を図-5に示す。ここで反応槽容積は2.4ℓ、回転速度は15rpmである。鉄酸化バクテリアは9K培地で通気培養してきたものを用いた。まず、酸化反応槽内に9K培地と鉄酸化バクテリアを加え、回分状態で数日間円板を回した。こうしてある程度バクテリアを円板表面に付着させた後、表-6に示す基質を連続的に投入した。基質のpHは2.3である。温度は10℃、20℃および30℃の3段階について行った。分析項目は第1鉄、全鉄、pHおよび細菌数である。

2-3-2 実験結果および考察

各RUNの実験期間はそれぞれ約1ヶ月で定常状態の判断は第1鉄の酸化率が一定値に達したか否かによって行ったが、どのRUNでもかなり明白な定常状態が得られた。滞留時間と第1鉄酸化率の関係を図-6に示す。これによると、20℃および30℃では滞留時間の増加と共に第1鉄酸化率も徐々に上昇して行き、両者の間にはほとんど差がない。しかし、10℃では滞留時間を長くしても第1鉄酸化率はほとんど

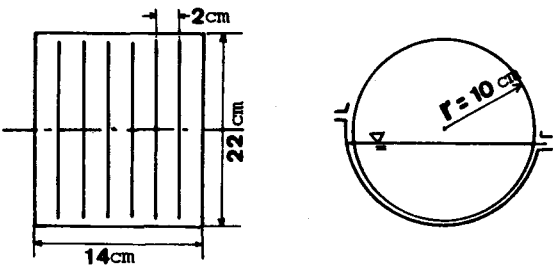


図-5 回転円板装置

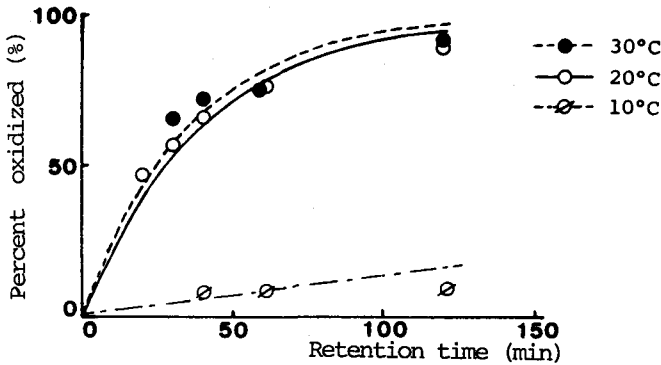


図-6 滞留時間対第1鉄酸化率

表-6 連続実験基質組成 (1ℓ中)

成分	量
$(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$	150 mg
KCl	5 mg
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	25 mg
$\text{K}_2 \text{HPO}_4$	25 mg
$\text{Ca} (\text{NO}_3)_2$	0.5 mg
10N $\text{H}_2 \text{SO}_4$	0.7 ml
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	2.5 g
(500 mg Fe^{2+}/ℓ)	

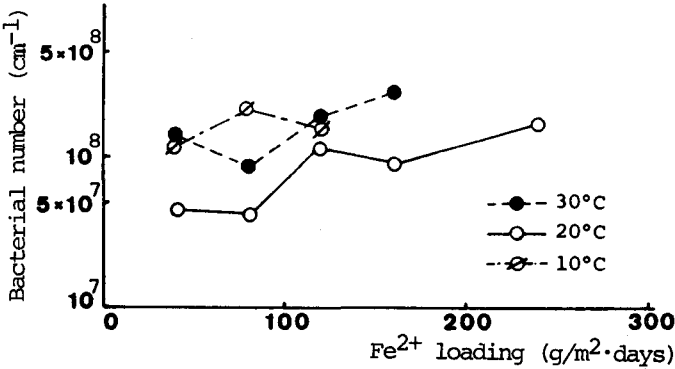


図-7 第1鉄負荷対付着菌数

上昇しなかった。図-7に示す通り付着菌数は、10℃においても、20℃およ

び30℃における付着菌数と大きな差はない。

このことから、10℃における第1鉄酸化率の低下は、鉄酸化バクテリアの第1鉄酸化活性が10℃では、20℃および30℃に比べ著しく低下するためであることが結論づけられる。すなわち、10℃から20℃の間に鉄酸化バクテリアの第1鉄酸化活性が急激に低下する臨界温度が存在することが考えられ、これは2-1における現地調査の結果と一致する。

3. 第1鉄酸化作用におよぼすグルコースの影響

3-1 実験方法

図-5に示した回転円板装置を用い回分状態で円板に鉄酸化バクテリアを付着させた後、表-6に示す基質にグルコースを加えたものを連続的に投入した。水温は30℃、滞留時間は60分、グルコース濃度は0~500mg/lまで6段階に変化させた。分析項目は2-3-1と同様であるが、この実験以後、全鉄は原子吸光光度計により測定した。

3-2 実験結果および考察

実験では、グルコースを基質に添加したRUNで、白い粘質物が発生し、円板表面にも付着した。そして、その量はグルコース濃度が高くなるほど多くなった。このことから、粘質物はグルコースを栄養源とする従属栄養生物であろうと思われるが詳細についてはわかっていない。グルコース濃度と第1鉄酸化率、グルコース濃度と付着菌数、グルコース濃度と付着菌1個当りの酸化速度の関係を各々図-8、図-9、図-10に示す。第1鉄酸化率は、グルコース濃度が5mg/lのRUN2、50mg/lのRUN3、100mg/lのRUN4ではほとんど影響を受けず、0mg/lのRUN1と同様に80%前後に落ち着いた。しかし、300mg/lのRUN5、500mg/lのRUN6では第1鉄酸化率はまったく低下してしまい、各々1.7%、5.6%となった。付着菌数は図-9に示すように第1鉄酸化率が上がらなかったRUN5、6で若干低下しているだけであるが付着菌1個当りの酸化速度は図-10に示すように、RUN5およびRUN6では他のRUNの約1/10の値となった。このこと

から、酸化率低下の大きな原因は、鉄酸化バクテリアの第1鉄酸化活性の大幅な低下であることが明らかとなった。また、第1鉄酸化活性の大幅な低下は鉄酸化バクテリアが、グルコースを利用し増殖する従属栄養細菌に変わってしまったことによるものと考えられるので、これを確認するため回分実験を行った。実験に用いたバクテリ

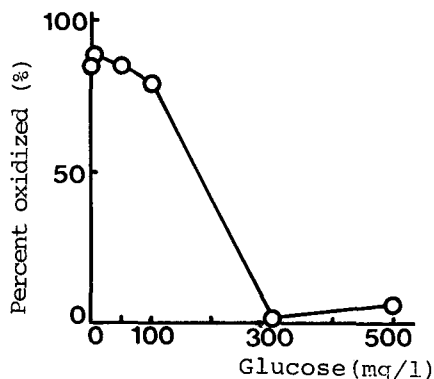


図-8 グルコース濃度対第1鉄酸化率

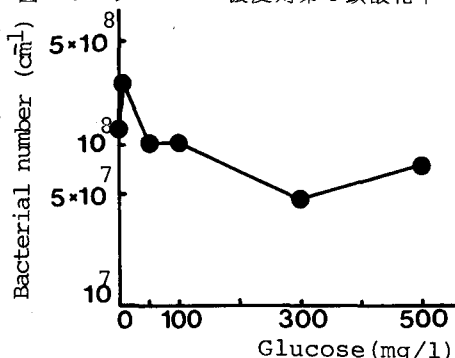


図-9 グルコース濃度対付着菌数

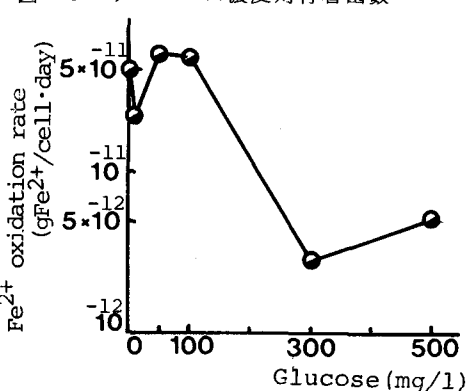


図-10 グルコース濃度対酸化速度

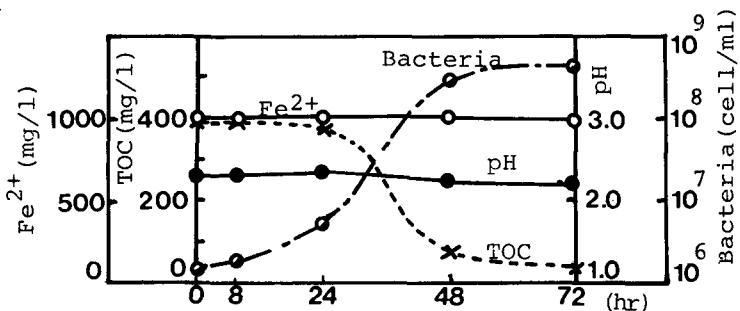


図-11 RUN5の付着菌を用いた回分実験

アはRUN5よりかき取ったもので、培地は第1鉄とグルコースの混合培地とした。培地の第1鉄濃度、グルコース濃度はともに1,000mg/ℓである。また、ここでのグルコース濃度はTOCで400mg/ℓに相当する。TOCは菌体を除いて測定した。pHは2.3に調整した。結果を図-11に示す。これによると実験を開始して24時間後にグルコース濃度（TOCで表わしてある）が減少しはじめ48時間後には80%、72時間後には約90%のグルコースが消費されていて、これに対応するように、細菌数が増加しているのがわかる。しかし第1鉄濃度にはほとんど変化はない。このことから、RUN5に付着していた鉄酸化バクテリアは連続的なグルコースの供給により、第1鉄ではなくグルコースを利用し増殖する従属栄養のバクテリアに変化していたことが明らかとなった。これら一連の実験結果から、鉄酸化バクテリアは連続状態ではグルコース濃度100～300mg/ℓの範囲においてその栄養形式を独立栄養から従属栄養に変えてしまうことが知られる。

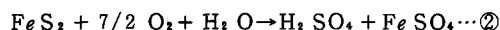
4. 鉄酸化バクテリア存在下における黄鉄鉱の酸化

4-1 実験方法

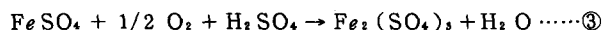
実験に使用した鉄酸化バクテリアは、9 K培地中の第1鉄が約85%酸化された状態にあるものを用いた。鉱石は、旧松尾鉱山から入手した黄鉄鉱（FeS₂）でこれを200メッシュに碎き80℃で2日間乾燥した。実験に用いる培地は9 K培地より、鉄酸化バクテリアのエネルギー源となる硫酸第1鉄を取り除いたものである。上記の菌溶液（2ml）、鉱石（10g）、培地（350ml）を500mlの坂口フラスコに入れ、対照と共に30℃で振とう培養した。分析項目は第1鉄、全鉄、硫酸イオン、pHで、硫酸イオンについては比濁法により分析し、他の項目はこれまでと同様の方法で分析した。

4-2 実験結果および考察

黄鉄鉱は②式で示す反応により、硫酸と硫酸第1鉄を生ずる²⁾



②式中の硫酸第1鉄は鉄酸化バクテリアにより③式のように硫酸第2鉄に酸化される。



③式によって生成した硫酸第2鉄は④式に示すように浸出剤として働き、黄鉄鉱から鉄が溶出され、同時にFeS₂ + 7Fe₂(SO₄)₃ + 8H₂O → 15FeSO₄ + 8H₂SO₄ ……④

硫酸も生成される。つまり、鉄酸化バクテリアにより、酸性鉱山排水の生成が上記のように促進されるわけである。今回の実験結果では、この作用を裏づけるように、鉄酸化バクテリアを接種したものは、接種しないものに比較して、鉄の溶出および硫酸イオンの生成が著しかった（図-12、13）。このことから、旧松尾鉱山内でも②～④の反応が起り、鉄酸化バクテリアが鉱山排水の生成に関与していることが知られた。

<謝辞> 試料採取の面で御協力下さいました建設省岩手工事事務所の各位に感謝申し上げます。

<参考文献> 1) Silverman et al., J. Bacteriol. 77, pp642～647 (1958)

2) 伊藤一郎, バクテリアリーチング, 講談社 (1976)

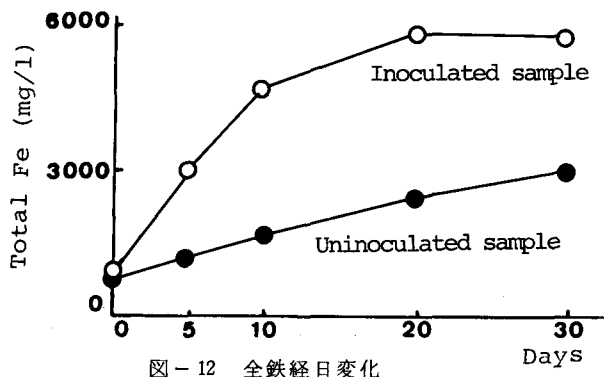


図-12 全鉄経日変化

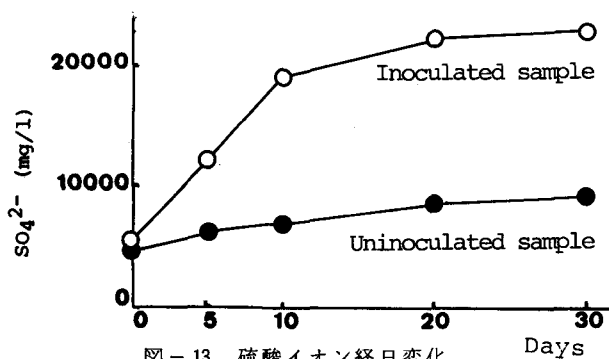


図-13 硫酸イオン経日変化