

氏 名	須 藤 孝 一
授 与 学 位	博 士 (工 学)
学 位 授 与 年 月 日	平 成 8 年 3 月 26 日
学 位 授 与 の 根 拠 法 規	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項
研 究 科 , 専 攻 の 名 称	東 北 大 学 大 学 院 工 学 研 究 科 (博 士 課 程) 資 源 工 学 専 攻
学 位 論 文 題 目	集 積 培 養 に よ る 鉄 酸 化 細 菌 お よ び 硫 黄 酸 化 細 菌 の 酸 化 挙 動
指 導 教 官	東 北 大 学 教 授 千 田 信
論 文 審 査 委 員	東 北 大 学 教 授 千 田 信 東 北 大 学 教 授 松 岡 功 東 北 大 学 教 授 榎 本 兵 治 東 北 大 学 教 授 野 池 達 也

論 文 内 容 要 旨

鉱業における微生物の利用法として主なものに鉱山排水処理とバイオリーチングとがある。このうち、鉱山排水処理では、鉱山から排出される酸性排水中の第一鉄イオンを微生物の働きにより第二鉄イオンに酸化することによって、その後の工程である中和処理工程における中和剤の使用量の低減が図られている。この方式は我が国の旧松尾鉱山の排水処理施設をはじめ、いくつかの休廃止鉱山に適用され、処理費用の低減と環境保全に貢献している。一方、バイオリーチングとは、硫化鉱物を酸化することにより生育するためのエネルギーを獲得できる特異な性質を持つ微生物を利用して、鉱石から有用な金属を溶出させ回収する技術であり、その具体的な適用方法により、ヒープリーチング、ダンプリーチングおよびインプレスリーチング等に分類されている。これらのリーチングは、主に通常のプロセス（採鉱－選鉱－製錬）では採算の合わないような低品位の銅鉱石を対象として行われている。これらの方法により生産される銅は、世界の生産量の10%近くに達しており、今後さらに増大の傾向にあると考えられている。

上述のプロセスで用いられている微生物は、主として好酸性の化学合成独立栄養細菌の一種の鉄酸化細菌 *Thiobacillus ferrooxidans* や硫黄酸化細菌 *T. thiooxidans* である。これらの細菌は、細胞を構成するための炭素源として二酸化炭素を用い、無機物のみを栄養源とし、鉄や硫黄を酸化する際に生育のためのエネルギーを獲得する。また、その最適生育 pH は 2 付近という、極めて特異な性質を持つ。これらの細菌に関する研究は、細菌の酵素の働きや細菌の微生物学的特性、細菌による酸化速度、排水処理やバイオリーチングのための反応装置の設計等数多く行われてきているが、実験に使用されているのは、主として単離操作を施した純粋培養菌である。ところが、実際の鉱山排水処理やバイオリーチングの操業現場における微生物反応系は、一般に外部から他の微生物が混入してくる開放系となっているため、様々な微生物種が共存する混合培養系が形成されている可能性が考えられる。従来、鉄酸化細菌や硫黄酸化細菌の生育する極端な酸性領域下では、一般の微生物はほとんど生育できないため、その混入はほとんど無視できるという考えが支配的であった。そのため、鉱山排水処理やバイオリーチングのプラント設計にあたっては、鉄酸化細菌や硫黄酸化細菌以外の微生物の存在は考慮されていなかった。しかしながら、近年の研究において、鉱山排水処理プラントやバイオリーチングの現場から従属栄養細菌や菌類、原生動物等が分離ないし同定されている。したがって、鉄酸化細菌や硫黄酸化細菌の純粋培養菌による挙動をそのまま鉱山排水処理やバイオリーチングの実操業環境に適用できるかどうかは疑問であり、それらの環境に生息する他の共存微生物の影響を十分に検討しておく必要がある。

そこで本研究では、これまで行われていなかった鉄酸化細菌や硫黄酸化細菌の生育とその基質酸化挙動に及ぼす共存する微生物の影響を解明し、さらに将来的にそれらを鉱業的に利用していくための手がかりとして、鉱山排水処理場から採取した微生物を含む溶液を用いて、鉱山排水処理やバイオリーチングが行われている現場に近い細菌の状態と単離

操作を行った理想的な状態における鉄酸化細菌および硫黄酸化細菌による酸化挙動の違いを検討することを目的とした。特に、硫黄基質集積培養においては、培養液中に観察された原生動物および菌類の同定を行い、それら二者と硫黄酸化細菌との相互関係について詳細に検討した。

本論文は以下の内容で5章により構成されている。

第1章「緒論」では、本論文の背景、意義および内容について述べ、次いで鉱山排水処理およびバイオリーチングに用いられる微生物の微生物学および生化学的特性に関する今までに得られている知見と、鉱山排水処理およびバイオリーチングにおける応用例について整理している。

第2章「鉄基質集積培養菌の酸化挙動」では、鉄基質集積培養菌と分離操作を行った鉄酸化細胞との差異を検討するために、栄養塩類無添加での回分培養により、第一鉄イオンの酸化実験を試みた。

本研究で用いた微生物は、旧松尾鉱山排水処理場から採取し、研究室において硫酸第一鉄を基質として長期間集積培養したものである。分離操作を行った細菌とは、この集積培養より9Kシルカゲル平板培地を用いて得たものである。

鉄基質集積培養菌および分離操作を行った鉄酸化細菌を用い、栄養塩類を添加せずに、三角フラスコを用いた回転式振とう法による第一鉄イオンの酸化実験を行った。その結果、集積培養菌の場合、鉄酸化細菌の増殖が確認され、それに伴って第一鉄イオンの酸化速度が増加した。一方、分離操作を行った鉄酸化細菌の場合、鉄酸化細菌の増殖は起こらず、第一鉄イオンの酸化速度はほぼ一定であり、さらに、実験時間が長くなると細菌の溶菌に伴って酸化速度も低下した。これらの差異は、集積培養の場合、鉄酸化細菌が外部からの供給なしに栄養源を獲得したことを意味している。このことは、集積培養においては、栄養塩類を積極的に添加しなくとも鉄酸化細菌の酸化活性を維持できたことを示す。これは、鉄酸化細菌と共存する他の微生物の効果であると考えられるが、鉄基質集積培養槽中には、顕微鏡による観察では共存微生物の存在は確認できなかった。しかし、この鉄基質集積培養菌と同一起源の硫黄基質集積培養においては、硫黄酸化細菌と共存する微生物の存在を確認している。よって、鉄基質集積培養においても、共存微生物が存在していると推定できる。ただし、鉄酸化細菌の菌体濃度は、回分培養において、硫黄酸化細菌の1/100程度であるため、共存微生物の濃度も低く抑えられていると推測される。また、本章で試みた栄養塩類無添加の実験は、集積培養と分離操作を行った単一菌種との挙動比較に極めて有効であることが明らかになった。

第3章「硫黄基質集積培養における硫黄酸化細菌と原生動物との相互関係」では、集積培養液中の硫黄酸化細菌と原生動物との関係について着目し、基質となる単体硫黄と無機栄養塩類を添加した富栄養型の回分培養を行い、原生動物が共存する場合としない場合の硫黄酸化細菌による単体硫黄の酸化挙動について比較検討した。

まず、鉄酸化細菌の場合と同様の微生物群を用いて、単体硫黄を基質とした硫黄基質集積培養を行った。その結果、培養液中に、鞭毛を持つ原生動物と糸状に成長する微生物が存在することを確認し、それらが *Bodo edax* および不完全菌類に属する *Exophiala* 属であると同定した。この原生動物は、培養液のpHが約0.6以下になると生育できなかった。

一方、この菌類は、硫黄酸化細菌を増殖させるための回分式集積培養においては、菌糸の成長は極めて遅く、その成長が認められるまでに長期間を要した。したがって、回分式集積培養において、微生物の接種後のある程度の期間は、硫黄酸化細菌と原生動物が優勢であり、菌類の存在は考慮しなくともよいとみなすことができる。

菌類の存在を考慮しなくてよい期間における硫黄基質集積培養菌による単体硫黄の酸化実験の結果、培養液中における硫黄酸化細菌の菌体濃度に対する原生動物の濃度の比は、 10^{-3} から 10^{-4} の値で、ほぼ一定となった。また、銅イオンを培地に添加した場合、原生動物は 1 mgdm^{-3} 以上の銅イオンにより生育阻害を受け、また、継代培養を行っても銅イオンに対する耐性を獲得しなかった。これに対し、硫黄酸化細菌は継代培養により 100 mgdm^{-3} の銅イオンに対して耐性を獲得したことから、銅イオンの添加は、両者の共存関係を崩し得ることが明らかになった。さらに、硫黄酸化細菌と原生動物が共存する系とそこから分離操作を行った硫黄酸化細菌単独の培養系との比較実験より、硫黄酸化細菌と原生動物の共存系による単体硫黄の酸化速度は、硫黄酸化細菌単独の培養系の場合よりも小さくなり、また、そのとき

の硫黄酸化細菌の見かけの増殖収率は単独系の約1/3となった。以上の結果より、原生動物は硫黄酸化細菌を捕食することにより生育しており、原生動物の存在は、回分培養において硫黄酸化細菌による単体硫黄の酸化速度を低下させる要因となるということが明らかになった。したがって、硫黄酸化細菌と原生動物との相互関係は、片利共生であるという結論を得た。

第4章「硫黄基質集積培養における硫黄酸化細菌と菌類との相互関係」では、集積培養液中の硫黄酸化細菌と菌類との関係について検討した。まず、第2章において共存微生物の存在する系と細菌単独の系を比較するのに有効であると示した、栄養塩類無添加における酸化実験を行った。その際、硫黄酸化細菌、原生動物および菌類の共存する集積培養系と硫黄酸化細菌単独の培養系による酸化挙動を比較した。次に、集積培養から菌類を分離し、菌類の生育と硫黄酸化細菌との関係について検討した。さらに、集積培養から原生動物を排除し、硫黄酸化細菌と菌類が共存する系を用いて富栄養の回分培養を行い、硫黄酸化細菌と菌類との相互関係を検討した。

栄養塩類無添加において、原生動物、菌類および硫黄酸化細菌が共存する集積培養系では、培養液のpHが0.6付近まで低下すると単体硫黄の酸化速度が増大する現象が確認され、そのとき硫黄酸化細菌の菌体数の増加および原生動物の濃度の減少がみられ、その後菌類の菌糸の成長が顕微鏡観察により認められた。一方、分離操作を行った硫黄酸化細菌単独の培養系の場合、初期の単体硫黄の酸化速度は一定となり、その後細菌の溶菌に伴って酸化速度は小さくなった。第3章で述べたように、原生動物は硫黄酸化細菌を一方向的に捕食していることから、硫黄酸化細菌、原生動物および菌類の三者が共存する系において、硫黄酸化細菌が増殖した原因は、主として菌類から栄養源が供給されたためと推定された。

そこで、菌類から供給される利用源について若干の検討を加えた。集積培養から分離された菌類は、グルコースで生育することが認められた。そこで、菌類をグルコースを基質として培養し、硫黄酸化細胞の栄養源となるリン酸イオンの放出を調べたところ、菌類による培養液中へのリン酸イオンの放出が認められた。また、菌類は硫黄酸化細菌が代謝物として放出するとされているピルビン酸等の有機物を利用して生育すると考えられているが、硫黄基質集積培養液から微生物および硫黄を除去した濾液を培地とした方が、ピルビン酸を含む培地よりもより良好な生育を示したことから、硫黄酸化細菌の代謝物だけではなく、細胞の溶菌により生じた有機物をも基質とすると推定できる。

次に、原生動物を銅イオン添加によって死滅させて富栄養の回分培養を行い、硫黄酸化細菌と菌類との関係について検討したところ、硫黄酸化細菌による単体硫黄の酸化速度は、原生動物が共存している場合より大きくなった。また、そのときの硫黄酸化細菌の見かけの増殖収率は、原生動物が共存している場合の約7倍となり、分離操作を行った硫黄酸化細菌単独の培養系の増殖収率の約2倍となった。

以上の結果より、集積培養による硫黄酸化細菌は、菌類との間において相利共生の関係にあるという結論が得られた。

第5章「結論」では、本研究で得られた知見を総括している。

審査結果の要旨

鉄酸化細菌および硫黄酸化細菌に関する研究は、純粋培養細菌を用いて数多く行われてきているが、実際の鉱山排水処理やバイオリーチングの操業現場における微生物反応系は、一般に外部から他の微生物が混入してくる開放系となっているため、様々な微生物種が共存する混合培養系が形成されている可能性が考えられる。本論文は、鉄酸化細菌や硫黄酸化細菌の生育とその基質酸化挙動に及ぼす共存する微生物の影響を解明するために、鉱山排水処理等の現場に近い集積培養菌と単離操作を行った鉄酸化細菌および硫黄酸化細菌による酸化挙動の違いを検討したもので、全編5章からなる。

第1章では、本論文の背景、意義および内容について述べている。

第2章では、鉄基質集積培養細菌と分離操作を施した鉄酸化細菌による基質酸化挙動を比較し、集積培養の場合、栄養塩類無添加での回分培養において、鉄酸化細菌が増殖し、それに伴って基質酸化速度が増加することを明らかにしている。これは、鉄酸化細菌と共存する他の微生物の効果により栄養塩類を積極的に添加しなくとも鉄酸化細菌の酸化活性を維持することを示すものであり、重要な成果である。また、栄養塩類無添加の実験は、集積培養と分離操作を行った単一菌種との挙動比較に極めて有効であることを示している。

第3章では、硫黄基質集積培養液に見出される原生動物 *Bodo edax* と硫黄酸化細菌との関係について検討し、原生動物は硫黄酸化細菌を捕食することにより生育しており、両者の相互関係は、原生動物の片利共生であるということをも初めて明らかにしている。また、原生動物は培養液の pH が約 0.6 以下になると生育できず、銅イオンに対する耐性を有していないことを明らかにしている。これらは、重要な知見である。

第4章では、硫黄基質集積培養液に見出された不完全菌類 *Exophiala* と硫黄酸化細菌との関係について原生動物が生育ができない条件下で検討を行い、菌類と硫黄酸化細菌が共存する系における硫黄酸化細菌の見かけの増殖収率が、硫黄酸化細菌単独の培養系の場合の2倍になることを明らかにするとともに、グルコースを基質として菌類を単独で培養して、培養液中へ硫黄酸化細菌の栄養源となるリン酸イオンを放出することを示し、硫黄基質集積培養における硫黄酸化細菌は、菌類との間において相利共生の関係にあるという重要な知見を導いている。

第5章では、本研究で得られた知見を総括している。

以上要するに、本論文は、鉱山排水処理やバイオリーチングの実操業現場における微生物環境を考慮して鉄酸化細菌および硫黄酸化細菌による基質酸化挙動を解明したもので、資源工学ならびに生物工学の発展に寄与するところが少ない。

よって、本論文は博士（工学）の学位論文として合格と認める。