

氏名	かわべ よししげ 川邊能成	
授与学位	博士(工学)	
学位授与年月日	平成12年3月23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)地球工学専攻	
学位論文題目	鉄酸化細菌の活性に及ぼす固体の影響	
指導教官	東北大学教授 千田 侑	
論文審査委員	主査 東北大学教授 千田 侑 東北大学教授 大村 達夫	東北大学教授 梅津 良昭 東北大学助教授 井上 千弘

論文内容要旨

第1章 緒論

鉄酸化細菌を活用した鉄工業プロセスは、エネルギー消費が少なく、環境への負荷も低いため、環境調和型のプロセスとして今後発展し、環境問題解決のキーテクノロジーのひとつとなるものと考えられる。しかし、鉄酸化細菌を利用した工業プロセスを広めていくためにはさまざまな問題点がある。例えば、廃水処理場などのバイオリアクターにおいては、鉄酸化細菌の増殖速度が遅いことから処理効率を向上させるために細菌を担体である固体物質に吸着濃縮させているが、担体に吸着した細菌の活性が低下するため、その改善が求められている。また、鉄酸化細菌自体の増殖速度および酸化能力が小さいため、バイオリアクターを大きくする必要があり、工業プロセスでの利用に制約がある。さらに、鉄山廃水やリーチング液中に塩化物イオンなど鉄酸化細菌の阻害物質が大量に含まれた場合、鉄酸化細菌を利用したプロセスの適用が困難になる。したがって今後、鉄酸化細菌を利用した工業プロセスに広く適用していくためには、その増殖の最適条件を検討あるいは改善していく研究や、鉄酸化細菌の反応自体を反応工学的な観点でとらえ、最適条件を得るための装置やプロセスの開発を目指すことが必要であると考えられる。

本論文は、鉄酸化細菌を利用した工業プロセスを広く適用させるために、バイオリアクターにおける担体の改善や鉄酸化細菌の阻害物質が大量に含まれた場合においても、鉄酸化細菌を利用したプロセスを適用させることを目指したものであり、鉄酸化細菌と固体物質との相互作用に関する研究、鉄酸化細菌の塩化物イオン阻害に及ぼす珪藻土の影響についてまとめたものである。

第2章 鉄酸化細菌に有効な固体の探索

鉄山廃水処理場などのバイオリアクターでは、担体である珪藻土や鉄沈殿物といった固体物質が重要な役割を果たしているが、これらの物質が鉄酸化細菌の活性に及ぼす影響についてほとんど検討されていない。また、一般的に鉄酸化細菌は固体物質の存在あるいは固体物質への吸着により第一鉄イオンの酸化活性が低下するといわれている。その要因については、固体物質による細胞の破壊、固体物質による阻害、溶存気体の問題などさまざまな理由が考えられるが、その要因は定かではない。したがって、廃水処理プロセスをより効率的に運転するためには鉄酸化細菌と固体物質との相互作用を検討し、鉄酸化細菌の活性を阻害しないような担体、さらにはその活動を向上させるような担体を探求していく必要がある。本章では鉄酸化細菌の培養液にさまざまな固体物質を添加し、細菌の固体物質への吸着および第一鉄イオンの酸化挙動を検討し、鉄酸化細菌の担体として有効な固体物質を探索することを目的としている。

鉄酸化細菌の培養液にガラスビーズを添加し、振とう培養すると添加量の増加に伴い第一鉄イオンの酸化終了までの時間が長くなり、第一鉄イオン酸化速度は低下した。この際、細菌はガラスビーズにほとんど吸着しなかった。一方、静置培養を行うとその酸化速度は無添加の場合とほとんど変わらなかったことから、細菌の細胞がガラスビーズにより破壊され、培養液中の菌体濃度が低下するため見かけ上第一鉄イオン酸化速度が低下するものと推測された。

また、鉄酸化細菌の培養液に活性炭を添加すると、瞬時に細菌は活性炭に吸着した。しかし、活性炭

が培養液中に存在すると細菌は第一鉄イオンを酸化しなくなった。一方、ガラスビーズの場合と同様に、静置培養を行うと、無添加の場合よりも第一鉄イオン酸化速度が大きくなった。静置培養下において、培養液中への酸素の供給は液相界面からの拡散のみによるため、鉄酸化細菌による第一鉄イオン酸化は気相と液相の界面近傍で行われているものと推測される。活性炭を添加し、静置培養した場合には、培養液の気相と液相の界面近傍に存在する細菌の菌体濃度が無添加の場合よりも大きいことが明らかになったことから、鉄酸化細菌が活性炭を阻害物と検知し避けるために、より多くの細菌が液相表面に存在するものと推察した。振とう培養した場合においては、強制的な流れのため、細菌と活性炭との接触頻度が増し活性炭表面に吸着されると考えられ、活性炭に吸着された鉄酸化細菌の鉄酸化酵素系が、何らかの理由で阻害を受けることにより、第一鉄イオンの生物酸化が生じなくなるものと推察した。

さらに、鉄酸化細菌の培養液にジャロサイトを添加した場合、細菌がジャロサイトに吸着するにもかかわらず、細菌の酸化活性は低下しない。したがって、本実験で用いたジャロサイトを担体として利用するのは有効ではあるものの、珪藻土のように第一鉄イオン酸化活性が高められるということにはなかった。

一方、鉄酸化細菌の培養液に珪藻土を添加した場合、鉄酸化細菌は珪藻土によく吸着した。それにもかかわらず酸化終了までの時間が無添加の場合に比べて短くなり、第一鉄イオン酸化速度が増加した。また、珪藻土の種類が異なっても少なくとも本実験で使用した三種類の珪藻土で同様な結果が得られたことから、珪藻土が培養液中に存在することにより、鉄酸化細菌になんらかの効果を及ぼし、鉄酸化細菌の第一鉄イオン酸化活性を高めているものといえる。以上のことから、鉄酸化細菌がよく吸着し、かつ第一鉄イオン酸化速度を大きくする珪藻土が、鉄酸化細菌に有効な固体であるということが明らかになった。

第3章 鉄酸化細菌に及ぼす珪藻土の効果

前章で得られた珪藻土が存在することにより第一鉄イオン酸化活性が高まるという結果について、その理由を解明することを目的として、鉄酸化細菌の第一鉄イオン酸化および増殖に及ぼす珪藻土の影響を検討した。また、珪藻土存在下では培養液中の全菌体数を把握することが困難であるため、珪藻土が培養液中に存在する場合の鉄酸化細菌による第一鉄イオン酸化および増殖挙動について、数学モデルによりシミュレーションし、速度論的解析を行った。

鉄酸化細菌の珪藻土への吸着はヘンリーの吸着等温式で表すことができた。また、鉄酸化細菌の増殖速度は非吸着細胞の増殖速度と吸着細胞の増殖速度との和で、基質消費速度は細菌の維持代謝による基質消費速度と増殖による基質消費速度との和で表された。

$$\frac{dX_T}{dt} = \left\{ \frac{\mu_{\max A} C_D H S}{(C_D H + 1)(K_{sA} + S)} + \frac{\mu_{\max L} S}{(C_D H + 1)(K_{sL} + S)} \right\} X_T$$

$$-\frac{dS}{dt} = \frac{1}{Y_{X/S}} \frac{dX_T}{dt} + \frac{V_{\max} S}{K_m + S} X_T$$

これらの速度式中の未知パラメータ ($\mu_{\max A}$, $\mu_{\max L}$, K_{sA} , K_{sL}) を実験データと比較し算出したところ、珪藻土吸着細胞の最大比増殖速度 $\mu_{\max A}$ [h^{-1}] が非吸着細胞の最大比増殖速度 $\mu_{\max L}$ [h^{-1}] よりも 15・20%ほど大きい値を示すことが明らかになり、鉄酸化細菌が珪藻土に吸着することにより増殖速度が大きくなることが明らかになった。

これらの反応速度式は、珪藻土以外の固体が存在する回分培養においても適用でき、細菌が吸着するため菌体濃度を測定することができない系において、増殖速度を評価するのにきわめて有効であることが明らかになった。

パラメータ	説明
$\mu_{\max A}$ [h^{-1}]	吸着細胞の最大比増殖速度
$\mu_{\max L}$ [h^{-1}]	非吸着細胞の最大比増殖速度
H [g/dm^3]	ヘンリー定数
K_m [mol/dm^3]	Michaelis 定数
K_{sA} [mol/dm^3]	吸着細胞の基質飽和定数
K_{sL} [mol/dm^3]	非吸着細胞の基質飽和定数
S [mol/dm^3]	基質 (Fe^{2+}) 濃度
V_{\max} [$\text{mol}/\text{cell}\cdot\text{h}$]	最大酸化速度
X_T [cells/dm^3]	全菌体数
$Y_{X/S}$ [cells/mol]	真の増殖収率

第4章 鉄酸化細菌の塩化物イオン阻害に及ぼす珪藻土の効果

第2章および第3章で述べたように、珪藻土を添加した鉄酸化細菌の培養液中において、珪藻土に吸着した鉄酸化細菌の増殖活性は増加することを明らかになっており、珪藻土が鉄酸化細菌の塩化物イオン阻害を回避する可能性がある。そこで、本章では、鉄酸化細菌の第一鉄イオン酸化や増殖に及ぼす塩化物イオン阻害機構を解明するとともに、塩化物イオン存在下において珪藻土が鉄酸化細菌の酸化活性および増殖活性に及ぼす影響について検討した。

鉄酸化細菌が細胞の維持代謝に消費する第一鉄イオン消費速度は、塩化物イオン濃度の増加にともない低下した。細菌1細胞当りの酵素量とその活性が一定と仮定し、酵素反応速度論的検討を行ったところ、鉄酸化細菌の鉄酸化酵素系は少なくとも生細胞に存在する状態では塩化物イオンにより拮抗阻害を受けることが明らかになった。また、塩化物イオンによる鉄酸化細菌の増殖阻害に対する速度式は、阻害剤の濃度の項を加えた修正 Monod 式によりある程度表現することができた。

また、塩化物イオン存在下における鉄酸化細菌の珪藻土への吸着は、塩化物イオン濃度 1.7mol/dm^3 までの範囲ではほとんど変わらず、5分以内で吸着平衡に達した。また、吸着平衡の状態における吸着量も 1.7mol/dm^3 までの範囲ではほとんど変化がなかった。鉄酸化細菌の増殖は、塩化物イオンにより阻害を受けたが、細菌を珪藻土に吸着させることによりその阻害作用が緩和された。塩化物イオンによる増殖阻害定数は非吸着細胞の場合、 $4.1 \times 10^{-4} \text{ mol}^2/\text{dm}^6$ 、珪藻土吸着細胞の場合、 $6.5 \times 10^{-4} \text{ mol}^2/\text{dm}^6$ となり、細菌が珪藻土に吸着することにより塩化物イオンによる増殖阻害が軽減されることが明らかになった。したがって、塩化物イオン存在下において珪藻土は、鉄酸化細菌の最大比増殖速度を上昇させる効果の他に、塩化物イオンによる増殖阻害を軽減させる効果があるといえる。

さらに、塩化物イオンが含まれる廃水を、鉄酸化細菌を用いた連続攪拌槽型反応装置で処理することを想定し、ケーススタディを行った結果、鉄酸化細菌の担体として珪藻土を使用することが有効であった。特に塩化物イオン濃度が $1.7 \times 10^{-1} \text{ mol/dm}^3$ 含まれる場合の臨界希釈率は、担体として珪藻土を使用した場合の方がジャロサイトの場合よりも60%大きくなり、塩化物イオンが多量に含まれる地域における廃水処理では、ジャロサイトを担体とした場合よりも処理効率がよくなることが示された。

第5章 結論

本章では前章まで得られた研究の結論をまとめ、本論文の結論とした。

審査結果の要旨

鉄酸化細菌を活用した鉱工業プロセスは、エネルギー消費が少なく、環境への負荷も低いいため、環境調和型のプロセスとして今後発展し、環境問題解決のキーテクノロジーのひとつとなるものと考えられる。しかし、鉱工業プロセスへの鉄酸化細菌利用には、増殖速度および鉄酸化速度が遅いためさまざまな問題点や制約があり、その改善および適用範囲の拡大が求められている。本論文では、鉄酸化細菌に有効な担体および鉄酸化細菌の Cl⁻阻害軽減を検討し、その生物活性の向上についてまとめたものであり、全編 5 章よりなる。

第 1 章は緒論である。

第 2 章では、ガラスビーズ、活性炭、ジャロサイトあるいは珪藻土を鉄酸化細菌の培養液に添加し、吸着および Fe²⁺酸化挙動から鉄酸化細菌に有効な固体物質を検討した。その結果、珪藻土を添加した場合のみ、細菌がよく吸着し、さらに Fe²⁺酸化活性が高まることが明らかになった。これは今まで報告されておらず、きわめて有用な知見である。

第 3 章では、前章で得られた珪藻土が存在することにより Fe²⁺酸化活性が高まるという結果について、その理由を検討した。珪藻土存在下における鉄酸化細菌の増殖速度式は修正 Monod 式、また、基質消費速度は細菌の維持代謝による基質消費速度と増殖による基質消費速度との和で表すことができた。また、鉄酸化細菌の Fe²⁺酸化活性が向上する理由は、珪藻土吸着細胞の最大比増殖速度が非吸着細胞のそれよりも約 20%ほど大きい値となるためであった。これらの反応速度式は、珪藻土以外の固体が存在する回分培養においても適用できるので、細菌が吸着するため菌体濃度を測定することが容易でない系における増殖速度の評価にきわめて有効である。

第 4 章では、鉄酸化細菌の Fe²⁺酸化や増殖に及ぼす Cl⁻阻害形式を解明するとともに、Cl⁻存在下において珪藻土が鉄酸化細菌の酸化活性および増殖活性に及ぼす影響について検討した。その結果、鉄酸化細菌の鉄酸化酵素は少なくとも生細胞に存在する状態では Cl⁻により拮抗阻害を受けることが明らかになった。また、鉄酸化細菌の増殖は、Cl⁻により阻害を受けたが、細菌を珪藻土に吸着させることによりその阻害作用が緩和されることも明らかになった。さらに、Cl⁻が含まれる廃水を、鉄酸化細菌を用いた連続攪拌槽型反応装置で処理することを想定し、ケーススタディを行った結果、特に Cl⁻濃度が 1.7×10^{-1} mol/dm³ 含まれる場合の臨界希釈率が、担体として珪藻土を使用した場合のほうがジャロサイトの場合よりも 60%大きくなり、Cl⁻が多量に含まれる地域における廃水処理では、担体として珪藻土を使用することが有効であることが示唆された。これらは、きわめて有用な結果である。

第 5 章は結論である。

以上要するに本論文は、鉄酸化細菌の活性に及ぼす固体の影響について検討し、珪藻土が鉄酸化細菌の担体として最適であり、これをバイオリクターなどに用いることにより、処理効率の改善が可能であるということを明らかにしている。また、塩化物イオンにより、鉄酸化細菌のプロセスが適用できない地域においては、珪藻土を担体として用いることにより、ある程度阻害を軽減できることも明らかにしており、環境システム工学および微生物工学の発展に寄与するところが少なくない。

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。