[農化 第 37 卷, 第 10 号, p. 576~579, 1963]

硫 黄 細 菌 の 生 理 (第 1 報)*

T. thiooxidans の金属硫酸塩に対する耐性および鉱物の浸出

田野達男, 今井和民 (岡山大学農学部)

昭和 38 年 3 月 22 日 受理

炭坑および種々の金属鉱山の坑内水, 滲透水, 排水等が強い酸性を示し, かつ種々の金属イオンを含んでいることは古くから知られていた. 1947 年 Colmer および Hinkle⁽¹⁾は土壌中などに存在していて, 硫黄を酸化する機能を有する *T. thiooxidans* と同じと思われるバクテリアと, 第一鉄を第二鉄に酸化するバクテリアを坑内水から分離している. ついで 1950 年には Colmer, Temple および Hinkle⁽²⁾ が第一鉄を第二鉄に酸化し, さらにチオ硫酸を硫酸に酸化するバクテリアを見出した. また Bryner, Beck, Davis および Wilson⁽³⁾は Bingham Canyon の排水から鉄酸化細菌と硫黄酸化細菌の両者を分離しており, 坑内水, 滲透水, 排水等が強い酸性を示す原因は, 種々の鉱山に存在する金属硫化物や硫黄が上に述べたような autotroph のバクテリアによって酸化を受けるためであることが多くの研究者により報告されている^(1,4,5). そこでこの autotroph のバクテリアの一つである *T. thiooxidans* について, 種々の金属イオンに対する抵抗性を検討した結果, 水銀以外の種々の金属に対してかなり強い耐性を持っていることがわかったので, この性質とこの細菌が培地中の硫黄を酸化して, 培養液を硫酸酸性にし, しかもこの強酸性の溶液中で生育増殖し得る特性を利用して種々の鉱物から金属を溶出する方法について検討した. そのうち, 窯業原料である粘土から含有量のできるだけ少ないことが要求されている鉄の溶出除去および低品位の二酸化マンガング鉱石からのマンガンの浸出について報告する.

I. 金属硫酸塩に対する抵抗性

(1) 実験方法

i) 培養液: 第 1 表に示したように片桐, 今井, 奥積⁽⁶⁾による OMN₁ 培地を基本培地として, これに金属硫酸塩を種々の濃度に加えたものを用いた.

ii) 培養法: 使用した菌は片桐, 今井, 奥積⁽⁶⁾によって分離された *T. thiooxidans* である. 培養液 80 ml を坂口フラスコに入れ, 30 分蒸気殺菌したものに, 別に同じ培養液で 7~10 日を週期として 30° で振とう培養した菌 20 ml を接種して 30° で 4~7 日間振とう培養したものを種菌とした. 第 1 表の基本培地 80 ml を坂口フラスコに入れ, 30 分蒸気殺菌して第 2 表, 第 3 表にあげたように種々の濃度の金属硫酸塩を加えて, 30° で 24 時間振とうした後, 種菌を 20 ml 接種して 30° で 7 日間振とう培養した.

第 1 表 基本培地	
KH ₂ PO ₄	0.4 g
MgSO ₄	0.03
CaCl ₂	0.025
FeSO ₄	0.001
(NH ₄) ₂ SO ₄	0.2
硫 黄	1
井 水	100 ml

iii) 分析方法: 植菌後直ちに 10 ml 採り出したもの, および培養終了後の培養液を東洋濾紙 No. 2 の濾紙で濾過し, pH は pH 試験紙で, 硫酸は Fritz⁽⁷⁾ の方法で, 菌体量は比濁から求めた. そして硫酸および菌体の増加の程度から阻害の有無を判定した. なお金属塩を添加したために培養液の着色したもの, たとえば Cu, Co, Cr, Ni 等は培養液の一定量をセロチューブに入れて, 最初 0.5 N の硫酸中で透析し, ついで蒸溜水中で透析した後, 再び一定量にして比濁により菌体量を求めた.

(2) 実験結果 第 2 表からわかるように Hg は 10⁻⁴ M ですでに強い阻害作用を及ぼし, 飽和溶液では菌の生育は全く見られなかった. Sn は 5×10⁻³ M で硫酸生成量, 菌体増加量とも対照に比べてかなり低く, 阻害作用の強いことを示している. また Cr, Co, Zr では 5×10⁻³ M, 3×10⁻² M および 5×10⁻² M で阻害作用が認められ, Cr に対してこの菌が耐性を示す濃度の限界はきわめてはっきりしている. Ni, Cu ではそれぞれ 5×10⁻³ M, 5×10⁻² M 前後から徐々に阻害作用が現われ, 特に Ni は阻害作用が現れてから, その濃度を 10 倍にしてもかなり硫酸も菌体も増加し, 20 倍量を添加したときにはじめて強い阻害作用が認められた. また第 3 表に示した濃度で Ba, Ca は飽和しているが全く阻害作用は認められないばかりでなく, Ba では著しい菌体の増加

* Physiological Studies on the Thiobacilli. Part I. Tolerance of *T. thiooxidans* to the Metallic Sulfates and Bacteria Leaching of Minerals.

By Tatsuo TANO, Kazutami IMAI (Department of Agricultural Chemistry, Okayama University)

第2表 培養液に金属硫酸塩を添加した時の pH, 硫酸量および菌体量

	添 加 量		pH		硫酸量 (g/100 ml)			菌 体 量 (mg/100 ml)	
			植菌後	最終	植菌後	最終	増加	植菌後	最終
Hg ₂ SO ₄	5 mg	1×10 ⁻⁴ M	1.8	1.2	0.32	0.45	0.13	0.1	0.2
SnSO ₄	116	5×10 ⁻³	1.4	1>	0.64	1.16	0.52	0.6	6.9
Cr ₂ (SO ₄) ₃ ·15 H ₂ O	198	3×10 ⁻³	2.0	"	0.88	2.45	1.57	0.2	15.0
"	331	5×10 ⁻³	1.4	1.0	0.75	0.76	0.01	—	—
CoSO ₄ ·7 H ₂ O	141	"	"	1>	0.64	2.04	1.40	—	19.2
"	846	3×10 ⁻²	2.2	1.8	0.83	0.88	0.05	—	4.2
NiSO ₄ ·6 H ₂ O	131	5×10 ⁻³	1.4	1>	0.64	1.69	1.05	0.6	12.5
"	786	3×10 ⁻²	2.2	"	0.83	1.57	0.74	0.2	12.0
"	1.14 g	6×10 ⁻²	1.8	"	1.14	1.78	0.64	0.5	8.0
"	2.62	1×10 ⁻¹	1.0	"	2.15	2.13	—0.02	0.8	0.8
Zr(SO ₄) ₂ ·4 H ₂ O	335 mg	1×10 ⁻²	1.2	"	0.61	3.05	2.44	0.2	12.6
"	1.88 g	5×10 ⁻²	1.0	"	1.57	2.30	0.73	0.3	—
CuSO ₄ ·5 H ₂ O	1.50	"	1.8	"	1.35	2.58	1.23	—	12.0
"	2.50	1×10 ⁻¹	1.0	"	2.14	2.57	0.93	0.8	7.4
対 照	—	—	2.0	"	0.30	2.14	1.84	0.1	15.9
"	—	—	"	"	"	2.12	1.82	"	12.0

第3表 培養液に金属硫酸塩を添加した時の pH, 硫酸量および菌体量

	添 加 量		pH		硫酸量 (g/100 ml)			菌 体 量 (mg/100 ml)	
			植菌後	最終	植菌後	最終	増加	植菌後	最終
BaSO ₄	23mg	1×10 ⁻³ M	1.0	1>	0.95	2.82	1.87	0.4	31.1
CaSO ₄	680	5×10 ⁻²	1.2	"	0.98	3.67	2.69	0.2	18.2
CdSO ₄ ·2 ² / ₃ H ₂ O	5.13 g	2×10 ⁻¹	1>	"	3.14	5.39	2.25	1.0	21.0
FeSO ₄ ·7 H ₂ O	5.56	"	1.4	"	2.46	3.81	1.35	—	13.5
"	11.1	4×10 ⁻¹	1.0	"	5.15	5.91	0.76	—	8.7
Al ₂ (SO ₄) ₃ ·17 H ₂ O	13.3	2×10 ⁻¹	1>	"	6.30	9.26	2.96	1.0	15.4
MnSO ₄ ·n H ₂ O	4.80	"	1.8	"	2.45	4.30	1.85	0.5	13.7
"	9.60	n=5 として 4×10 ⁻¹	1.0	"	5.13	5.80	0.67	0.8	6.8
LiSO ₄ ·H ₂ O	5.12	"	1>	"	5.10	8.18	3.08	1.0	21.0
MgSO ₄ ·7 H ₂ O	9.84	"	1.0	"	5.14	5.83	0.69	0.8	10.4
Na ₂ SO ₄	7.10	5×10 ⁻¹	"	"	5.13	7.01	1.88	"	18.8
K ₂ SO ₄	10.0	"	1>	"	6.45	7.79	1.34	1.0	16.7
ZnSO ₄ ·7 H ₂ O	14.4	5×10 ⁻¹	"	"	5.88	7.89	2.01	"	15.1

を示している。Ca, Fe, Al, Mn, Mg 等では 2×10⁻¹ M 付近まで, Li, Na, K, Zn 等では 5×10⁻¹ M 付近まで, すなわち硫酸塩にして 10% 前後の濃度までほとんど対照と同程度かあるいはそれ以上に, 硫酸, 菌体とも増加しており, これらの金属に対して強い耐性を持っていることがわかる。

II. 粘土中に含まれている鉄の溶出除去

窯業原料, 化学原料, 冶金原料, 建設材料等は, その目的により鉄の含有量の可及的に少ないことが要求される。そこで窯業原料の一つである粘土を用いて, 鉄の溶出除去についての実験を行った。

第4表 粘土の除鉄に用いた培地組成

実験 番号	粘土 (g)	硫黄 (g)	(NH ₄) ₂ SO ₄ (g)	KH ₂ PO ₄ (g)
I	10	0	0	0
II	10	0	0	0
III	10	1	0.1	0
IV	10	0	0.1	0
V	10	0.5	0.1	0.1
VI	10	0.5	0.1	0
VII	10	0	0	0.1
VIII	10	1	0	0
IX	10	0.7	0	0

(1) 実験方法

i) 培養液: 井水 100 ml に第4表に示すものをそれぞれ加えて培養液とした。実験に使用したのは京都産の粘土で 0.57% の鉄を含み茶褐色に着色しており, Fe 以外には SiO₂, Al, Mg, Mn, Ca, Ti 等が認められたが, この菌の生育に強い阻害作用のある Hg, Sn は検出されなかった。そこでこの粘土を 100 mesh 以下の粉末として用いた。

ii) 培養方法: 培養液を第1図に示したような三口フラスコに 80 ml 入れて, 約 2 時間通気かくはんして粘土を均一に分散せ

第 1 図 粘土の除鉄に用いた培養装置

しめた後、別に第 1 表の基本培地で 3~6 日間振とう培養した菌を 20 ml 接種し、室温（実験中は 15~23° であった）で 6~7 日間毎時約 350 ml の通気かくはん培養をした。

iii) 分析方法：培養終了後遠心分離により不溶物を遠沈し、洗液が中性付近になるまで不溶物を繰返して洗った後、105° で乾燥し洗液とともに試料とした。pH は pH 試験紙、硫酸は Fritz の方法で求めた。洗液中の鉄は、洗液の一定量を取り有機物を分解した後、試料中の Fe^{++} を Fe^{+++} にして 20% ロダンアンモンを指示薬として N/100 硝酸第一水銀で滴定し Fe_2O_3 として含有量を求めた。粘土中の鉄は試料を弗化水素酸で分解し、硫酸 (1:5) に溶解し蒸留水で一定量として、洗液と同様にして Fe_2O_3 として含有量を求めた。

(2) 実験結果 第 5 表の II は最初に硫酸を加えて pH を 1 以下にし、他のものと

第 5 表 洗液および粘土の分析結果

	pH		洗 液				粘 土		
	植菌後	最終	液量 ml	色	硫酸量 g	溶出した鉄の 量 mg	色	含有して いる鉄の 量 mg	鉄の溶 出率 %
I	—	7.0	160	僅に白濁	0	trace	赤褐色	565	0
II	—	1>	672	淡黄色	1.34	229	淡黄色	339	40
III	2.6	"	630	"	1.46	58	赤褐色	512	10
VI	"	2.0	534	僅に白濁	0.41	6	"	560	1
V	2.4	1>	502	淡黄色	0.72	12	"	530	2
VI	1.6	"	783	"	1.28	57	黄褐色	505	10
VII	2.4	"	520	"	—	—	赤褐色	538	—
VIII	"	"	645	黄 色	2.89	345	白 色	210	61
IX	1.0	"	488	"	2.08	291	"	250	52

と同様に 7 日間通気かくはんした。この表からわかるように粘土だけで菌を接種しないものは、もちろん鉄の溶出は全く見られないが、少量の硫酸を加えて菌を接種したものは、II の最初から硫酸を加えて pH を下げておいたものよりも多量の鉄を溶出することができ

た。このことは、鉄の溶出が単に培養液中の硫酸によるものだけでなくこの菌の生理的な作用にも関係があるのではないかと考えられる。また培養液に $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, KH_2PO_4 を加えなかった VIII, IX の方がよい結果が得られたことは、菌の生育に必要な素資源および無機塩類は接種した 20 ml の種の中の量で充分であり、この粘土では鉄の溶出にはむしろ少ない方がよいのではないと思われる。

III. 低品位マンガン鉱からのマンガンの浸出

この菌を用いて低品位の鉱石から金属を浸出せしめて回収する目的で、低品位の二酸化マンガン鉱石からマンガンを浸出する実験を行った。

(1) 実験方法

i) 培養液および培養法：第 1 表に示した基本培地に、二酸化マンガン鉱を 100 mesh 以下の粉末にして添加した。鉱石は SiO_2 55.0%, Fe_2O_3 25.0%, MnO_2 10.6%, MgO 5.32%, その他少量の Ca, Al, S を含んでいるが、菌の生育に強い阻害作用を有する Hg, Sn, Cr 等の金属は見出されなかった。また、鉱石中のマンガンは日本工業規格によるマンガン鉱石中の二酸化マンガン分析法 (JIS M 8233) による分析結果では、大部分二酸化マンガンであった。

鉱石の粉末を添加した培養液 80 ml を坂口フラスコにとり、30 分蒸気殺菌した後、別に第 1 表の基本培地で 3~6 日間振とう培養した菌を 20 ml 接種して 30° で 3~9 日間振とう培養した。

iii) 分析方法：培養終了後遠心分離により不溶物を遠沈し、上澄を試料とした。また鉱石中の全マンガン量は鉱石

第 2 図 鉱石 3% 添加の場合の pH, マンガン溶出量
実線：試料 点線：対照

を弗化水素酸で処理し、硫酸にとかして両者とも過ヨウ素酸で酸化発色せしめて比色法により定量した。

(2) 実験結果 菌は最初マンガン鉱石 1% 添加したものに 3~4 回植えつき、ついで 1.5%, 3% と順次添加量の多い培地に植えついで行ったが、この鉱石では 5% 添加のものには菌は生育し得なかった。このように菌を植えついでいくとマンガン溶出量はしだいに増加し、第 2 図に示したように鉱石 3% を添加して 9 日間振とう培養したものでは、含まれているマンガンの 69% を溶出することができた。これは無菌的に処理した対照試料に比べて 100 倍近い溶出量である。

要 約

T. thiooxidans の培養液中に種々の金属硫酸塩を加え、それに対する耐性を調べた結果、Hg では菌は全く生育しなかった。Sn は 10^{-4} M, Cr は 5×10^{-3} M, Co は 3×10^{-2} M, Zr は 5×10^{-2} M, Cu は 10^{-1} M 付近で阻害作用を受け、Ni では 5×10^{-3} M 付近から阻害がはじまり 10^{-1} M で強く阻害作用を受けた。また Cd, Fe, Al, Mn, Mg 等では 2×10^{-1} M 付近まで、Li, Na, K, Zn 等では 5×10^{-1} M 付近まではほとんど阻害作用は認められない。特に Ba, Ca では飽和していてもほとんど影響は見られなかった。そこでこの菌の上述の特性と、硫黄を酸化して培養液を硫酸酸性にすることから、窯業原料である粘土中の除鉄および低品位の二酸化マンガン鉱からのマンガンの浸出について検討を加え、前者では鉄の 61% を溶出除去し、後者ではマンガンの 69% を浸出することができた。

- (1) A. R. Colmer, M. E. Hinkle: *Science*, **106**, 253 (1947).
- (2) A. R. Colmer, K. L. Temple, M. E. Hinkle: *J. Bact.*, **59**, 317 (1950).
- (3) L. C. Bryner, J. V. Beck, D. B. Davis, D. G. Wilson: *Ind. Eng. Chem.*, **46**, 2587 (1954).
- (4) W. W. Leathen, S. A. Braley, L. D. Mc-

- Intyre: *Applied Microbiol.*, **1**, 61 (1953).
- (5) K. L. Temple, E. W. Delchamps: *ibid.*, **1**, 255 (1953).
- (6) 片桐英郎, 今井和民, 奥積昌世: 日本農芸化学会大会講演 (1961 年 4 月).
- (7) I. Fritz, M. Fruland: *Anal. Chem.*, **26**, 1593 (1954).