硫化銅鉱のバクテリア・リーチングに関する研究

Ferrobacillus ferrooxidans, *Thiobacillus thiooxidans* および
Thiobacillus ferrooxidans の特性について (第2報)

(挿図 8 ~13, 図版 I)

渡辺 庄美・内田 武司・古谷 進

Study on Bacteria Leaching of Sulfide Ores.
Properties of *F. ferrooxidans*, *Th. thiooxidans* and
Th. ferrooxidans. (2)

By Atsumi WATANABE, Takeshi UCHIDA and Susumu FURUYA

1. 緒 言

第1報において、小真木鉱山の坑内水中には第一鉄を第二鉄に酸化する *Ferrobacillus ferrooxidans*, 元素硫黄を硫酸に酸化する *Thiobacillus thiooxidans* および *Thiobacillus concretivorus* などの棲息していることが確かめられたが、チオ硫酸塩を酸化する能力を有する *Thiobacillus ferrooxidans* の棲息については明らかにすることのできなかつたこと、そして分離された *Ferrobacillus ferrooxidans* について若干の生理的特性を明らかにしたことなどを報告した。

本報は第1報に引きつづいて *Ferrobacillus ferrooxidans*, *Thiobacillus thiooxidans* および古遠部鉱山坑内水より分離された *Thiobacillus ferrooxidans* などの生理的特性を明らかにしたので、ここに報告する。

2. *Thiobacillus ferrooxidans* の分離

1. 供試水

供試水は古遠部鉱山より採取したもので、供試水の化学分析結果は表6に示した通りである。

No. 1, 2 の坑内水は No. 3 のそれに比べて pH が高く, Cu, Zn, Fe および SO_4 濃度はきわめて低かつた。No. 3 の坑内水の pH は 3.2 と低く, 特に No. 3 の坑内水中には Fe^{2+} 濃度が大きく, 全鉄の約90%が Fe^{2+} の形で存在した。

2. 培養方法

Th. ferrooxidans の分離を行なうとともに, *F. ferrooxidans* および *Th. thiooxidans*

表6 供試水の化学分析結果

No.	供試水の種類	pH	Cu ppm	Zn ppm	Fe ppm		SO ₄ %
					Fe ²⁺	Fe ³⁺	
1	湯の川4LN向立入	6.6	0.02	tr.	2.98	0.60	0.062
2	大黒沢東部3LN向立入	7.7	0.004	tr.	0.07	0.17	0.002
3	大黒沢西部OL3ループ	3.2	387.0	191.9	795.6	76.3	0.429

の分離もあわせて行なつた。Corrick¹³⁾ の液体培養液 100 ml を 300 ml 容の坂口培養フラスコに入れ、これに供試水 2 ml を接種して綿栓をほどし、振とう培養方法(図Ⅳ)によつて 26℃ の恒温培養室にて10日間の連続培養を 4 回繰り返して、培養液に感応するバクテリアをそれぞれ分離せしめた。

3. 実験結果および考察

4 回培養後のバクテリアの増殖状況を示せば表 7 に示した通りである。なおバクテリアの増殖数は位相差顕微鏡で、トーマの計算盤を使用して測定した。

表7 培養後の pH および菌体の増殖変化

No.	供試水の種類	<i>Th. ferrooxidans</i>		<i>F. ferrooxidans</i>		<i>Th. thiooxidans</i>	
		pH	菌体数*	pH	菌体数*	pH	菌体数*
1	湯の川4LN向立入	4.6	—	2.4	—	5.2	—
2	大黒沢東部3LN向立入	4.2	—	2.3	1	5.2	—
3	大黒沢西部OL3ループ	2.3	7	2.3	2	2.8	13

* 菌体数 (×10⁸/ml)

No. 1, 2 の坑内水を接種した培地にはバクテリアの存在はほとんど確認できず、培地 pH の低下もおこなかつた。しかし、No. 3 の坑内水からは各種属が分離でき、特に、*Th. thiooxidans* および *Th. ferrooxidans* の培地は著しい pH の低下がおこり、バクテリアの旺盛な増殖が認められた。この培養結果より大黒沢西部 OL 3 ループより採取した坑内水にはチオ硫酸塩に感応するバクテリア (*Th. ferrooxidans*) の棲息していることが確かめられた。

3. *F. ferrooxidans* の硫酸第一鉄の酸化におよぼす接種菌量の影響

1. 実験方法

蒸気滅菌した 300 ml 容の三角フラスコに 9 K 培養液 100 ml を入れ、これに小真木鉱山坑内水から分離された鉄酸化バクテリアを 9K 培養液で 7 日間の通気培養¹⁶⁾ (図Ⅲ) を

6回繰り返して得られた含菌溶液を0, 1, 2, 4, 7および10 ml/接種し, 26°Cの恒温培養室において11日間の通気培養を行なった. 培養中 Fe^{2+} をチンメルマン・ラインハルト法を適用して測定し, 第一鉄の酸化割合を算出した.

2. 実験結果および考察

培養中の Fe^{2+} 酸化割合を測定した結果を示せば図8の通りである.

図8 接種量と第一鉄の酸化

接種量の大きいほど第一鉄の酸化は促進される, 接種量1.0 ml では11日間の培養で, 培養初期の Fe^{2+} 濃度の70%が Fe^{3+} に転換されたにすぎなかったが, 2.0 ml の接種になると11日間の培養で99%が Fe^{3+} に転換され, 培地の第一鉄のほとんどが Fe^{3+} に酸化された. 更に, 4.0, 7.0, 10.0 ml と接種量が大きくなると, 一段と第一鉄の酸化は促進され, 8日間の培養で97および99%の鉄酸化割合を示した. なお, 無接種においては培養期間中第一鉄の酸化はほとんど認められなかった.

4. *F. ferrooxidans* の銅耐性

Zimmerley⁷⁾ (1958) らはビンガム・キャニオンの坑内水から分離された *Th. ferrooxidans* は銅濃度を順次高めた培養液で培養を繰り返すと, バクテリアの銅耐性は次第に増大し, ついに約 12,000 ppm·Cu に耐性をもったバクテリアのつくりだされたことを明らかにした.

本実験は小真木鉱山坑内水から分離された *F. ferrooxidans* が銅の毒性にどの程度の耐性を持つかを確かめた。

1. 実験方法

蒸気滅菌した 250 ml 容の三角フラスコに 9K 培養液 100 ml を入れ、これに化学用硫酸銅をもつて銅濃度が 5,000 ppm になるように加え、この中に小真木鉱山坑内水から分離された鉄酸化細菌の 7 日間培養を 10 回繰り返した含菌溶液 2 ml を接種して室温下で通気培養を行なった。次に、この培養において細菌の増殖および第一鉄の酸化が確かめられたとき、この含菌溶液を接種菌として、新たに 10,000 ppm・Cu を含有する培地に接種して同様に通気培養を行なう。このように銅を含む培地で増殖した細菌を銅濃度を順次高めた培地に接種しつつ細菌の銅耐性を第一鉄の酸化割合の面から確かめることとした。

培養期間中 Fe^{2+} を常法により測定するとともに、位相差顕微鏡によつて細菌の増殖の有無を確かめた。なお、無接種および銅を添加しない培地に接種したものを対照としてそれぞれ準備した。

2. 実験結果および考察

培養期間中培地の Fe^{2+} を測定し、 Fe^{2+} 酸化割合を算出した結果は表 8 および図 9 の通りである。

図9 銅耐性菌による第一鉄の酸化

表 8 銅培地における第一鉄の酸化 Fe^{2+} g/1000ml

添加銅濃度 (ppm・Cu)	接種の有無	培 養 日 数 (日)									
		0	4	6	7	8	10	11	12	13	14
5,000	無 接 種	8.3(0)	—	7.8(6)	—	7.8(6)	—	7.8(6)	7.8(6)	—	—
	含 菌	7.8(0)	—	7.1(9)	—	5.9(24)	—	1.4(82)	0.05(99)	—	—
10,000	無 接 種	8.9(0)	8.5(4)	8.2(8)	—	7.9(11)	—	5.9(34)	—	—	—
	含 菌	8.4(0)	7.8(7)	7.0(17)	—	1.8(79)	—	0.09(99)	—	—	—
15,000	無 接 種	8.3(0)	—	8.2(1)	8.2(1)	—	—	—	7.6(8)	—	7.6(8)
	含 菌	8.3(0)	—	7.0(16)	1.9(77)	—	—	—	0.18(98)	—	0.09(99)
20,000	無 接 種	8.8(0)	—	8.0(9)	—	8.0(9)	7.9(10)	—	—	6.2(30)	—
	含 菌	8.5(0)	—	6.8(20)	—	4.7(45)	0.11(99)	—	—	0.09(99)	—
25,000	無 接 種	6.7(0)	6.4(4)	6.3(6)	—	6.3(6)	5.7(15)	—	—	—	—
	含 菌	6.7(0)	6.5(3)	4.6(31)	—	0.18(97)	0.14(98)	—	—	—	—
0,0	含 菌	7.1(0)	6.8(4)	5.8(18)	4.3(39)	—	0.10(99)	—	—	—	—

() Fe^{2+} の酸化割合を示す

坑内水から分離された鉄酸化バクテリアを一挙に 5,000 ppm・Cu を含む培地に接種して培養したところ、第一鉄の酸化割合は銅無添加培地のそれに比べて若干抑えられたが、12日間と培養をつづけると、培地の第一鉄の97%が第二鉄に転換された。次いで、ここに増殖した含菌溶液を 10,000 ppm・Cu と増大した銅培地に接種したところ、鉄酸化力は減退することなく、11日間の培養で第一鉄の99%が第二鉄に転換され、銅無添加培地の鉄酸化力と大差が示されなかつた。更に、15,000, 20,000 ppm・Cu と銅濃度を増大してもバクテリアは増殖し、培地中の第一鉄の酸化されることが確かめられた。そして、25,000 ppm・Cu という高濃度の銅培地においても矢張りこのバクテリアは増殖し、10日間の培養で第一鉄の98%が第二鉄に転換された。この第一鉄の酸化速度は 5,000 ppm の銅培地のそれに比べて一層大きく、また、銅無添加培地の鉄酸化速度と大差が示されなかつた。

これ以上に銅濃度を高めた培地での実験は取行なわなかつたが、このバクテリアの銅耐性は銅培地での培養の繰り返しにより次第に増大し、25,000 ppm・Cu の培地においてもバクテリアは増殖し、鉄酸化力をも保持していることが認められた。

5. *F. ferrooxidans* の硫黄の酸化

Unz¹⁷⁾ および Lundgren (1961) らは元素硫黄を含んだ 9K 培養液に *Th. ferrooxidans* および *F. ferrooxidans* を接種して培養すると両種属とも増殖を始め、培養日数の経過につれて培地の硫酸塩の生成は増大し、pH の低下することを確認している。

本実験は小真木鉱山坑内水から分離された *F. ferrooxidans* に硫黄酸化能力があるかどうかを確かめるため取り行なつた。

1. 実験方法

滅菌した 9K 培養液 100 ml を 300 ml 容の坂口培養フラスコに入れ、これに粉末硫黄 0.1 および 1.0 g をそれぞれ添加しこの中に鉄酸化バクテリアの 7 日間培養を 14 回繰り返した含菌溶液 2 ml を接種して 26°C の恒温培養室で12日間の振とう培養を行ない、培養中培地の pH, Fe²⁺ および菌体数を常法によりそれぞれ測定した。

2. 実験結果および考察

得られた結果は表 9 および図 10 に示した通りである。

硫黄を添加すると、添加量の大きいほどバクテリアの増殖および第一鉄の酸化の抑えられることが認められた。すなわち 1.0 g/100 ml (培地) の硫黄培地では12日間の培養で、わずか 9 % が第二鉄に転換されたにすぎなかつたが、0.1 g/100 ml (培地) においては12日間の培養で、培地中の Fe²⁺ は完全に Fe³⁺ に酸化された。この 0.1 g・S 培地における Fe²⁺ 酸化速度およびバクテリアの増殖数は硫黄無添加培地のそれに比べて著しく小さかつたが、培地の pH は培養開始時の 2.3 から 1.4 と大きく低下していることが認められた。この事実、ここに使用したバクテリアは硫黄を利用しつつ第一鉄を酸化する能力を持つている

表9 *F. ferrooxidans* による硫黄および第一鉄の酸化

S添加量 g/100ml		pH		培養日数 (Fe^{2+} g/l, 1000ml)					培養後の 菌数*
		初期	培養後	直 後	3	6	9	12	
含 菌	1.0	2.3	1.9	8.5(0)	—	8.3(2)	8.1(5)	7.7(9)	0.2
	0.1	2.3	1.4	8.5(0)	—	5.4(37)	1.5(82)	0.0(100)	1.0
	0.0	2.3	2.4	8.5(0)	0.0(100)	—	—	—	6.0
滅 菌	1.0	2.3	2.3	8.5(0)	—	8.5(0)	—	8.5(0)	0.0
	0.1	2.3	2.3	8.5(0)	—	8.5(0)	—	8.5(0)	0.0

() Fe^{2+} 酸化割合, * 菌数 ($\times 10^3/\text{ml}$)

図10 硫黄の存在下における第一鉄の酸化

証左であると考えられた。なお、滅菌培地においては培養期間中第一鉄の酸化は全く認められず、pHの低下もおこらなかった。

6. *F. ferrooxidans* の有機物の利用

Bryner および Jameson¹⁸⁾ (1958) らは *Th. ferrooxidans* の Pyrite の酸化におよぼす各種有機物 (グルコース, 尿素, ペプトン, サク酸ソーダ, 蟻酸ソーダ) の影響を研究

したところ、用いた有機物の多くは 0.5 % 以上の濃度で鉄の酸化に阻害的影響をあらわし、蟻酸およびサク酸は 0.025 % 濃度で鉄の酸化を阻害し、また、一般に糖類は鉄の酸化に阻害的影響をもたないことなどを明らかにしている。

本実験は小真木鉱山坑内水から分離された *F. ferrooxidans* が第一鉄の利用において、有機物の存在が阻害の因子となるかどうかを確かめた。

1. 実験方法

滅菌した 9K 培養液 100 ml を 300 ml 容の坂口培養フラスコに入れ、これに有機物としてグルコースは 0.01~1.0 g、尿素は 0.1~1.0 g、ペプトンは 0.1~1.0 g をそれぞれ加え、この中に小真木鉱山坑内水から分離された鉄酸化細菌の 7 日間培養を 40 回繰り返した含菌溶液 2 ml を接種し、26°C の恒温培養室で 12 日間の振とう培養を行ない、培養中常法により Fe^{2+} および菌体数をそれぞれ測定した。なお、有機物を添加しない培地を対照として設けた。

2. 実験結果および考察

得られた結果は表 10~12 および図 11 に示した通りである。

グルコースは添加量の増大につれて、細菌の増殖は著しく旺盛となるが、第一鉄の酸化には阻害的影響があらわれた。しかし 100 ml (培地) 中 0.01~0.05 g のグルコースの添加では無添加のそれに比べて第一鉄の酸化割合に大きな差異は示されなかつた。また、0.6 g 以上の添加量になると、培養初期の細菌の増殖は若干抑えられるが、培養日数の経過につれて旺盛な増殖を示すようになった。そして、細菌の増殖数は第一鉄の酸化完了時頃最大となり、それ以上に培養を続けると増殖は逐次減退した。

尿素は添加量の増大につれて、第一鉄の酸化および細菌の増殖に阻害的影響をあらわした。しかし 100 ml 培地中 0.1 g の添加では無添加のそれに比べて第一鉄の酸化割合に差異が示されなかつた。

ペプトンの添加も添加量の増大につれて、第一鉄の酸化および細菌の増殖に阻害的影響をあらわしたが、100 ml 中 0.1 g の添加では第一鉄の酸化に阻害的影響はなかつた。以上、尿素およびペプトンなどの種類の有機物はその添加量が 100 ml 培地当り 0.2 g 以上に大きくなると、第一鉄の酸化および細菌の増殖に阻害的影響をあらわすが、グルコースは添加量の増大につれて細菌の増殖を促進せしめた。しかし、0.1 g 以上と添加量が大きくなると矢張り第一鉄の酸化に阻害的影響をあらわした。

7. *F. ferrooxidans* によるチオ硫酸塩の酸化

小真木鉱山坑内水から分離された *F. ferrooxidans* のチオ硫酸塩に対する酸化能力を確かめた。なお対照として古遠部鉱山大黒沢西部 OL3 ループ坑内水から分離された *Th. ferrooxidans* および小真木鉱山小三郎下一坑道坑内水から分離された *Th. thiooxidans* を用い、チオ硫酸塩に対する酸化能力をそれぞれ比較検討した。

表10 第一鉄の酸化におよぼすグルコースの影響 (Fe²⁺ g/1,000 ml)

グルコース 添加量 g/100ml	培 養 日 数											
	直 後		1		2		3		4		5	
	pH	Fe ²⁺ 菌数	Fe ²⁺ 菌数	Fe ²⁺ 菌数	Fe ²⁺ 菌数	Fe ²⁺ 菌数	Fe ²⁺ 菌数	Fe ²⁺ 菌数	Fe ²⁺ 菌数	Fe ²⁺ 菌数	Fe ²⁺ 菌数	pH
0.0	2.3	8.8	0.2	8.4(10)	0.4	3.5(61)	1.00.0(100)	2.0	—	3.0	3.0	2.1
0.01	2.3	8.9	0.2	8.7(3)	0.2	4.6(48)	1.00.0(100)	5.0	—	4.0	3.0	2.1
0.05	2.3	9.1	0.2	8.8(3)	0.2	4.2(53)	6.00.0(100)	8.0	—	8.0	5.0	2.1
0.1	2.3	9.1	0.2	8.9(3)	0.2	5.5(39)	10.00.0(100)	11.0	—	9.0	7.0	2.1
0.2	2.3	8.8	0.2	8.6(3)	0.2	5.4(39)	9.00.0(100)	14.0	—	15.0	11.0	2.1
0.4	2.3	8.9	0.2	8.6(3)	0.2	6.3(29)	5.00.0(100)	11.0	—	22.0	23.0	2.1
0.6	2.3	8.9	0.2	8.6(3)	0.2	6.8(24)	5.01.4(84)	9.00.0(100)	24.0	25.0	17.0	2.1
0.8	2.3	9.0	0.2	8.7(4)	0.2	7.0(22)	5.01.6(82)	6.00.0(100)	23.0	26.0	19.0	2.1
1.0	2.3	9.0	0.2	8.8(3)	0.2	7.0(22)	3.05.7(38)	4.00.9(46)	23.0	25.0	18.0	2.1

表11 第一鉄の酸化におよぼす尿素の影響 (Fe²⁺ g/1,000 ml)

尿 素 の 添 加 量 g/100ml	培 養 日 数											
	直 後		1		2		3		5		9	
	pH	Fe ²⁺ 菌数	Fe ²⁺ 菌数	Fe ²⁺ 菌数	Fe ²⁺ 菌数	Fe ²⁺ 菌数	Fe ²⁺ 菌数	Fe ²⁺ 菌数	Fe ²⁺ 菌数	Fe ²⁺ 菌数	pH	菌 数
0.0	2.3	7.9	0.2	6.5(18)	1.0	0.6(92)	2.0	0.0(100)	3.0	4.0	3.0	2.2
0.1	2.3	7.9	0.2	6.5(18)	0.4	0.4(94)	1.0	0.0(100)	1.0	2.0	2.0	2.1
0.2	2.3	7.9	0.2	6.5(18)	0.2	0.9(89)	1.0	0.0(100)	1.0	1.0	1.0	2.3
0.5	2.3	7.9	0.2	6.6(17)	0.2	1.4(82)	1.0	0.0(100)	1.0	1.0	0.4	0.2
1.0	2.3	7.9	0.2	6.7(15)	0.2	2.2(72)	0.4	0.0(100)	0.4	0.4	0.2	2.3

表12 第一鉄の酸化におよぼすペプトンの影響 (Fe²⁺ g/1,000ml)

ペプトン 添 加 量 g/100ml	培 養 日 数											
	直 後		1		2		3		5		9	
	pH	Fe ²⁺ 菌数	Fe ²⁺ 菌数	Fe ²⁺ 菌数	Fe ²⁺ 菌数	Fe ²⁺ 菌数	Fe ²⁺ 菌数	Fe ²⁺ 菌数	Fe ²⁺ 菌数	Fe ²⁺ 菌数	pH	Fe ²⁺ 菌数
0.0	2.3	7.9	0.2	6.5(18)	1.0	0.7(91)	2.00.0(100)	3.0	—	4.0	—	2.0
0.1	2.3	7.9	0.2	6.8(18)	0.2	0.8(90)	0.40.0(100)	1.0	—	1.0	—	—
0.2	2.3	7.9	0.2	7.4(7)	0.2	3.1(61)	0.40.0(100)	0.4	—	0.4	—	—
0.5	2.3	7.9	0.2	7.9(0)	0.2	7.9(0)	0.27.9(0)	0.07.4(6)	0.07.3(7)	7.1(10)	0.0	0.0
1.0	2.3	7.9	0.2	7.9(0)	0.2	7.9(0)	0.27.9(0)	0.07.4(6)	0.07.4(6)	7.3(8)	0.0	7.1(10)

() Fe²⁺ の酸化割合%, 菌数 (×10⁸/ml)

○通気培養法

種 属	培 養 日 数															
	直 後		2		4		6		8		10		12		14	
	pH	菌数	pH	菌数	pH	菌数	pH	菌数	pH	菌数	pH	菌数	pH	菌数	pH	菌数
F. F	5.2	0.2	4.8	0.4	4.8	0.4	4.7	0.4	4.7	0.4	4.7	0.4	4.7	0.2	4.9	0.2
T. F	5.2	0.4	4.5	0.4	4.5	0.4	2.9	2.0	2.1	3.6	2.1	3.8	1.8	5.6	1.6	6.0
T. T	5.2	0.4	4.8	0.4	4.8	0.4	4.5	0.2	4.2	0.2	4.2	0.4	4.0	0.4	3.8	1.0

F. F : *F. ferrooxidans*, T. F : *Th. ferrooxidans*, T. T : *Th. thiooxidans*
 菌 数 ($\times 10^8/\text{ml}$)

図12 培地の pH および菌体数の変化
(通気培養法)

振とう培養, 通気培養と培養方法の差異により菌体の増殖程度が異なつた. 振とう培養では各種属とも増殖が少なく, 培地の pH 変化も小さかつた. *Th. ferrooxidans* の培地においては培養14日でバクテリアの増殖があらわれ始めたが, *F. ferrooxidans* および *Th. thiooxidans* の培地においては増殖がおこななかつた. いっぽう, 通気培養においては, 培養6日で *Th. ferrooxidans* の急激な増殖が始まり, と同時に, 培地 pH の低下がおこつた. そして培養日数の経過につれて増殖は次第に大きくなり, pH も培養14日で 1.6 と著しく低下した. *Th. thiooxidans* の培地は *Th. ferrooxidans* のような pH の著しい低下, バクテリアの著しい増殖は示されなかつたが, 矢張り日数の経過につれて pH の低下, 緩慢なバクテリアの増殖が示された. しかし *F. ferrooxidans* の培地においてはバクテ

リアの増殖, pH の変化は殆んど示されなかつた。

pH の低下はチオ硫酸塩の酸化の結果と考えられることから, バクテリアの増殖, pH の低下の殆んど認められなかつた *F. ferrooxidans* はチオ硫酸塩を利用する能力があるかどうかは明らかになしえなかつたが, これに対し, *Th. ferrooxidans* はチオ硫酸塩をよく利用して増殖することが認められ, *Th. thiooxidans* はその利用能力の小さいことなどがわかつた。また, *Th. ferrooxidans* は振とう培養より通気培養によつて旺盛な増殖を示した。

8. *F. ferrooxidans*, *Th. ferrooxidans* および *Th. thiooxidans* による黄銅鉱の浸出

硫化鉱物を利用するバクテリアの種属については明らかにされていない点もあるが, Zimmerley, Wilson および Prater⁷⁾ (1958) らは銅, モリブデン, クローム, チタニウムなどの鉱石の浸出に *Th. ferrooxidans* を利用しており, Templ および Delchamps¹⁹⁾ らは瀝青炭に含まれる黄鉄鉱は *Th. ferrooxidans* により利用されるが, *Th. thiooxidans* は黄鉄鉱の酸化に関与しないことを明らかにし, Bryner, Beck, Davis および Wilson⁶⁾ (1954) らはビンガム・キャニオン銅鉱床の坑内水から分離された *Th. ferrooxidans* は黄鉄鉱および黄銅鉱の酸化に関与することを浸透実験によつて確認した。

Th. ferrooxidans を硫化鉱の浸出に利用した研究者は多く, Corrick および Sutton²⁰⁾ (1964) は *Th. ferrooxidans* および *F. ferrooxidans* を用いての興味ある実験を行ない *Th. ferrooxidans* は黄銅鉱中の鉄をよく利用するが, *F. ferrooxidans* はこれを殆んど利用しないこと, しかし黄鉄鉱中の鉄は *F. ferrooxidans* の方がよく利用することなどを明らかにした。Unz および Lundgren¹⁷⁾ (1961) は *F. ferrooxidans*, *Th. ferrooxidans* および *Th. thiooxidans* の栄養的特性を研究した結果, *F. ferrooxidans* と *Th. ferrooxidans* との区別はつきがたく, ただチオ硫酸塩を利用する程度に差があるにすぎないという。

以上, *F. ferrooxidans* と *Th. ferrooxidans* とは性質がよく類似し, 両者の区別は困難のようであるが, 硫化鉱の浸出には *Th. ferrooxidans* がよく利用されていることは明らかなようである。

そこで, われわれは小真木, 古遠部鉱山坑内水から分離された *F. ferrooxidans*, *Th. ferrooxidans* および *Th. thiooxidans* の3種属が黄銅鉱をエネルギー源として利用するその程度に差異があるかどうかを調べ, 今後バクテリア・リーチングを進めるための参考とした。

1. 試料鉱石

尾谷沢鉱山産の鉱石(黄銅鉱)を-325 mesh に粉碎したものを試料に供した。試料の分析結果は次の通りである。

表14 試料鉱石の化学分析結果 (%)

Cu	Zn	Pb	Fe	S
17.53	0.13	0.0	22.23	24.91

2. 実験方法

滅菌した Corrick^{13),16)} (1960) の3種属の培養液 150 ml を 300 ml 容の培養フラスコにそれぞれ入れ、この中に試料鉱石 2 g を加えてよく攪拌し、これに小真木鉱山坑内水より分離された *F. ferrooxidans* (9K 培地¹⁶⁾ にて7日間培養を90回繰り返したもの)、*Th. thiooxidans* (硫黄培地¹⁶⁾ にて10日間培養を7回繰り返したもの) および古遠部鉱山坑内水より分離された *Th. ferrooxidans* (チオ硫酸塩培地¹⁶⁾ にて10日間培養を4回繰り返したもの) の含菌溶液 2 ml をそれぞれの種属の培地に接種し、26°C の恒温培養室にて 110 rpm の交互運動をもつ振とう培養法 (図Ⅳ) により50日間の浸出を行なつた。培養中10日毎に一定量の浸出液をとり、常法により pH, Fe²⁺ および 菌体数を、また Cu はアミン錯塩法によりそれぞれ測定した。

なお、鉱石の浸出に用いた培養液には培養液の組成として含まれるエネルギー源 (硫酸第一鉄, チオ硫酸ソーダ, 硫黄) は加えなかつた。

3. 実験結果および考察

浸出の結果を示せば表15および図13に示した通りである。

表15 バクテリアによる黄銅鉱の浸出

種 属 (含・無菌の別)	培養50日後の値					50日間の積算銅量 mg/150ml	銅浸出率 (%)
	pH	菌 体 数 ($\times 10^8$ /ml)	Fe ²⁺ ppm	T-Fe ppm	Cu ppm		
無 菌	2.6	—	tr.	tr.	10	25.0	7.1
F. F 含菌	2.0	1	〃	553	510	236.8	67.5
T. F 含菌	1.9	2	〃	553	870	301.8	86.1
T. T 含菌	2.1	1	〃	tr.	64	28.9	8.2

3種属のうちで、黄銅鉱の浸出に最も大きな力のあつたのは *Th. ferrooxidans* で、50日間の培養で黄銅鉱中の銅の86%を溶出した、次いで *F. ferrooxidans* で、68%の銅が溶出した。しかし *Th. thiooxidans* は黄銅鉱の溶出には影響をおよぼさず、溶出銅量は無菌のそれと大差が示されなかつた。また、*Th. thiooxidans* は *F. ferrooxidans* および *Th. ferrooxidans* に比べて増殖が緩慢があつた。

9. 要 約

1. 古遠部鉱山大黒沢西部 OL3 ループ坑内水中からチオ硫酸塩を酸化する *Th. ferroo-*

図13 各種属による黄銅鉱の浸出曲線

図IV 振とう培養法

xidans が分離された。

2. 鉄酸化バクテリア (*F. ferrooxidans*) による第一鉄の酸化は接種菌量の大きいほど促進される。接種量 1.0 ml/100 ml (培地) では11日間の培養で、培養初期の Fe^{2+} 濃度の70%が Fe^{3+} に転換されたにすぎなかったが、2.0 ml の接種では99%が Fe^{3+} に転換された。そして4.0~10.0 ml と接種が大きくなると、第一鉄の酸化は一段と促進され、8日間の培養で97~99%が Fe^{3+} に転換された。

3. 鉄酸化バクテリアの銅耐性は硫酸銅の濃度を順次高めた培地での培養の繰り返しによつて逐次増大し、25 g/l の銅 (Cu) 濃度に耐性が増大した。

4. 鉄酸化バクテリアは第一鉄を酸化するのみならず、硫黄も酸化する能力を持つが、多量の硫黄が存在すると第一鉄の酸化は抑制される。

5. 鉄酸化バクテリアによる第一鉄の酸化におよぼす有機物の影響を追求したところ、尿素およびペプトンは0.2%以上の濃度において第一鉄の酸化およびバクテリアの増殖に阻害の影響を示した。

グルコースは添加量の増大につれてバクテリアの増殖を促進せしめた。しかし、0.1%以上の濃度になると、第一鉄の酸化に阻害の影響を示した。

6. 鉄酸化バクテリアのチオ硫酸塩の利用については明らかでなかったが、鉄硫黄酸化バクテリア (*Th. ferrooxidans*) はチオ硫酸塩をよく利用して増殖し、そして硫黄酸化バクテリア (*Th. thiooxidans*) はチオ硫酸塩を利用する力が小さかった。

7. 鉄硫黄酸化バクテリアおよび鉄酸化バクテリアはエネルギー源として黄銅鉱を利用することができた。鉄硫黄酸化バクテリアは50日間の振とう培養で黄銅鉱中から86%の銅を溶出し、鉄酸化バクテリアは68%の銅を溶出した。しかし、硫黄酸化バクテリアは黄銅鉱からの銅の溶出には影響をおよぼさなかった。

参 考 文 献

16. 渡辺庄美, 内田武司, 古谷 進: 金属鉱山坑内水中の鉄硫黄酸化バクテリアの同定および鉄酸化バクテリアの特性について (第1報). 陸水雑, 26, 4, 153~164, 1965.
17. RICHARD, F. U. and D. G. LUNDGREN: A comparative nutritional study of three chemoautotrophic bacteria; *Ferrobacillus ferrooxidans*, *Thiobacillus ferrooxidans*, and *Thiobacillus thiooxidans*. Soil Sci., 92, 5, 302~313, 1961.
18. BRYNER, L. C. and A. K. JAMESON: Microorganisms in leaching sulfide minerals. App. Microbiol., 6, 4, 285~286, 1958.
19. エス・イ・クズネツォフ, エム・ウェ・イワーノフ, エス・エス・リャリーコフ (飯塚 広, 都留信也共訳): 地球微生物学, p. 126, 1965.
20. SUTTON, J. A. and J. D. CORRICK: Leaching copper sulfide minerals with selected autotrophic bacteria. Bureau of Mines Rept. of Investigations, 6423, 1964.

(筆者：渡辺庄美，内田武司，古谷 進，三菱金属鉱業株式会社中央研究所，大宮市；
Atsumi WATANABE, Takeshi UCHIDA and Susumu FURUYA, Central Research
Laboratory, Mitsubishi Metal Mining Co., LTD., Omiya City)

SUMMARY

- (1). The species of the thiosulfate-oxidizing bacteria (*Th. ferrooxidans*) have been isolated from Frutobe mine water (Daikokuzawa, west, O.L. No. 3 loop).
- (2). The iron oxidation rates by *F. ferrooxidans* were accelerated by increasing the size of the inoculum, at inoculum of one ml per 150 ml of medium converted to the ferric state about 70% of initial Fe^{2+} concentrations in 11 days of incubation and at inocula of 2 ml converted to the ferric state about 99%. By increasing the size of the inoculum, up to 4~10 ml per 150ml of medium, converted to the ferric state 97~99% in 8 days of incubation.
- (3). By breeding successive generations of *F. ferrooxidans* in culture media successively more concentrated in dissolved copper (CuSO_4 , solu.), the tolerance of the bacteria was increased to approximately 25 grams of the copper per liter.
- (4). The strain of *F. ferrooxidans* could oxidize elemental sulfur as well as ferrous iron, but the presence of the large amounts of elemental sulfur suppressed the iron oxidizing ability of this organism.
- (5). On the studies of the influence of various organic substances on the oxidation of ferrous iron by *F. ferrooxidans*, urea and peptone retard the oxidation of iron and the growth of bacteria at concentrations greater than 0.2%. Glucose was able to accelerate the growth of bacteria by increasing the amounts, but retarded the oxidation of iron at concentrations greater than 0.1%.
- (6). It was not evident that the strain of *F. ferrooxidans* utilizes thiosulfate, but *Th. ferrooxidans* was able to grow using thiosulfate as the energy source and *Th. thiooxidans* utilized a little thiosulfate.
- (7). *Th. ferrooxidans* and *F. ferrooxidans* could utilize chalcopyrite as a source of energy. *Th. ferrooxidans* leached 86 % of the copper from chalcopyrite and *F. ferrooxidans* leached 68% in 50 days at 26°C on a reciprocal shaker. *Th. thiooxidans* had no effect on the dissolution of copper from chalcopyrite.