

酸性坑廃水における鉄酸化細菌と硫黄酸化細菌の探索

Search for Iron-Oxidizing Bacteria and Sulfur-Oxidizing Bacteria from Acid Mine Drainage

○藤井洸気¹, 小池美弥², 谷川実², 西村克史^{2,3}*Kouki Fujii¹, Miya Koike², Minoru Tanigawa², Katsushi Nishimura^{2,3}

Abstract: At present, there are about 5000 closed mines in Japan, and these acid mine drainage contain a large amount of acid and metal components, causing environmental problems such as water pollution. In this study, we investigated the characteristics of iron-oxidizing bacteria and the presence of sulfur-oxidizing bacteria in the samples in order to improve the efficiency and to reduce treatment cost of acid mine drainage

1. 目的

現在日本には、休廃止鉱山がおよそ 5000 あり、これらの坑廃水は、多量の酸と金属成分を含んでいるため、坑廃水処理を行わなければならない。その坑廃水処理のコストを削減するために、pH 2.0 ~ 3.0 という酸性条件下において生育する好酸性鉄酸化細菌を用いて Fe²⁺ を Fe³⁺へ酸化し、その後炭酸カルシウムを用いて中和する方法が導入されている。本研究では、鉄酸化細菌を使って鉱山の坑廃水処理の効率化とさらなるコスト削減を目的として、休廃止鉱山から採取した鉄酸化細菌の性質を調べた。また、休廃止鉱山周辺の水の pH の低下の原因となるサンプル中の鉄酸化細菌と硫黄酸化細菌の存在量を調べた。

2. 方法

2.1 培養

鉱山から採取したサンプルを Silverman 9K 培地 (pH 2.0) に添加し振盪培養 (110 rpm, 27°C) を行い、鉄酸化細菌の存在を調べた。鉄酸化細菌が増殖した培養液には不溶性の鉄酸化物が生成している為、濁度法によって増殖を測定することが出来ない。よって、ロダン塩法を用いて Fe³⁺ を測定することにより、間接的に鉄酸化細菌の増殖を調べた。鉱山から採取したサンプルを S6 medium に加え振盪培養 (110 rpm, 27°C) を行い、硫黄酸化細菌の存在を調べた。休廃止鉱山周辺の水の pH の低下の原因となる硫黄酸化細菌の有無を調べる為、培地の pH を測定した。

2.2 鉄酸化細菌の性質

鉄酸化細菌の生育に対する pH の影響を調べるため、

pH の異なる培地に植菌し、生育を調べた。また、坑廃水処理を行うには耐塩性を持つ鉄酸化細菌が必要になってくる為、培地に 0 ~ 400 mM NaCl を添加し、耐塩性を調べた。さらに、銅を含む坑廃水の処理に有用な鉄酸化細菌を見つける為、培地に 0 ~ 100 mM CuSO₂·5H₂O を添加し耐銅性を調べた。

2.3 鉄酸化細菌の単離および同定

Silverman 9K 固体培地を作製し、培養液を播種し、静置 (27°C) 培養した。生育したシングルコロニーを Silverman 9K 液体培地に植菌し、培養した。遠心分離によって集菌し、DNA 抽出、PCR による 16SrDNA の増幅、アガロースゲル電気泳動を行った。得られた増幅断片を精製し、配列を解析し、DDBJ の ClustalW を用いて分子系統樹を作成した。

3. 結果および考察

3.1 酸性坑廃水中の鉄酸化細菌および硫黄酸化細菌の存在

鉱山より得られたサンプルを Silverman 9K 培地で培養し、鉄酸化細菌の存在を調べた結果、ほぼ全てのサンプルに鉄酸化細菌が存在することが確認された。一方、硫黄酸化細菌は約 8 割のサンプル中に存在することが分かった。

3.2 鉄酸化細菌の性質

培地 pH 2.0 ~ 4.0 で培養した結果、4.0 の条件でも生育可能な鉄酸化細菌が存在した。耐塩性を調べた結果、12 種のサンプルの内 9 種のサンプル中に耐塩性を持つ鉄酸化細菌が存在することが分かった。耐銅性を調べた結果、12 種のサンプルの内 11 種のサンプル中に耐銅性を持つ鉄酸化細菌が存在することが分かった。

3.3 鉄酸化細菌の単離及び同定

pH 4.0 の培地中で生育可能であった細菌 (3.2) 中の一種の 16SrDNA 解析の結果、鉄酸化細菌の一種であることが判明した。しかし、系統樹を作成したところ既知の鉄酸化細菌ではなく、新奇の好酸性鉄酸化細菌であると考えられた。

1 : 日大理工・学部・応化 2 : 日大理工・教員・応化 3 : 日大短大・教員・応化