

## 研究紹介

## 酸性鉱山廃水の 効果的な生物学的処理プロセスの開発

上村 一雄・金尾 忠芳  
(農芸化学コース)

### Development of Effective Biological Treatment Process for Acid Mine Drainage

Kazuo Kamimura and Tadayoshi Kanao  
(Course of Agrochemical Bioscience)

Acid mine drainage (AMD) is acidic and generally enriched with iron, aluminum, sulfate and heavy metals, such as lead and cadmium. AMD is a growing problem of emerging concern that cause detrimental effects to the environment and living organisms. Yanahara mine in Misaki Town, Okayama, Japan, had mainly produced pyrite for sulfuric acid manufacture. Although it was closed in 1991, AMD is being generated from the mine now. A passive treatment based on the biological oxidation of ferrous iron is a promising strategy for AMD remediation. AMD from Yanahara mine is treated in a plant using iron-oxidizing bacteria, *Acidithiobacillus ferrooxidans* and *Ferrovum* spp. The AMD generation continues for several centuries with dramatic consequences on the receiving environments. Therefore, the development of sustainable and cost effective treatment process is required. A development of the effective biological treatment process with an iron oxidation reactor operated at pH 3.5 is described in this report. Economic aspects are also discussed.

**Key words :** acid mine drainage, bioremediation, iron-oxidizing bacteria, microbial community, *Acidithiobacillus ferrooxidans*

#### はじめに

鉄酸化細菌 *Acidithiobacillus ferrooxidans* (以前は *Thiobacillus ferrooxidans* と呼ばれていた) は、二価鉄 ( $\text{Fe}^{2+}$ ) と還元型無機硫黄化合物 ( $\text{H}_2\text{S}$ ,  $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ ,  $\text{S}_4\text{O}_6^{2-}$ ,  $\text{S}^0$  など) を酸化してエネルギーを獲得し、二酸化炭素を固定して生育する好酸性の化学合成独立栄養細菌である。この細菌は、硫化金属鉱石から金属を回収する技術であるバイオリッチングに利用されている。バイオリッチングでは鉄の酸化が重要であるため、その酸化機構が詳細に研究されており、様々な鉄酸化細菌の鉄酸化機構のモデルとして使用されている<sup>1)</sup>。また、バイオリッチングでは硫黄の酸化も必要であるが、*A. ferrooxidans* は

還元型硫黄化合物も酸化できることから、硫黄の酸化機構に関する研究も多くなされている。筆者らもこの細菌の硫黄代謝機構を研究し、新しい硫黄代謝酵素とその遺伝子をいくつか報告してきた<sup>2-8)</sup>。

日本の硫化鉱石を採掘していた鉱山の多くはその採掘が休止されているが、坑内にはまだ鉱石が残存している。このよう休鉱山からは、バイオリッチングの作用で鉄や金属イオンを含有する酸性の鉱山廃水(鉱水)が流出している。放置すると河川や湖の酸性化などの鉱害を引き起こすため、発生源対策と発生した鉱水の処理が行われている。鉱水の処理には、化学的処理方法と生物学的処理方法があるが、ここでは、鉄酸化細菌を利用した鉱水処理の現状と課題を紹介し、我々の研究室で実施してきた効果的な処理プロセスの開発研究を紹介する。

#### 1. *A. ferrooxidans* の鉱水生成への関与

*A. ferrooxidans* はバイオリッチングに使用されるだけでなく、酸性鉱山廃水の生成にも関与している。鉄、銅、亜鉛、鉛などの金属は、黄鉄鉱 ( $\text{FeS}_2$ )、黄銅鉱 ( $\text{CuFeS}_2$ )、輝銅鉱 ( $\text{Cu}_2\text{S}$ )、閃亜鉛鉱 ( $\text{ZnS}$ )、方鉛鉱 ( $\text{PbS}$ ) などの硫化鉱石として地殻に存在している。黄鉄鉱 ( $\text{FeS}_2$ ) を含有する鉱山からは、自然発生的に  $\text{Fe}^{2+}$  を多く含有する硫酸酸性の鉱水が流出しているのが一般的な現象である。この鉱水の生成機構は以下のように考えることができる。黄鉄鉱と  $\text{Fe}^{3+}$  を含んだ水が接触すると、硫黄成分は硫黄 ( $\text{S}^0$ ) に、鉄は  $\text{Fe}^{2+}$  となって溶解する。 $\text{S}^0$  は硫黄酸化細菌によって硫酸 ( $\text{SO}_4^{2-}$ ) に酸化されるため、 $\text{Fe}^{2+}$  を含んだ酸性水が形成される。生じた  $\text{Fe}^{2+}$  は鉄酸化細菌によって酸化され、 $\text{Fe}^{3+}$  に変換される。この  $\text{Fe}^{3+}$  はリッチングの触媒として働くことができ、黄鉄鉱からの鉄の溶出が加速される。バイオリッチングは、鉱石から金属を回収する技術であるが、同時に鉱水の発生を伴い、鉄酸化細菌や硫黄酸化細菌がその生成に関与していることになる<sup>9-11)</sup>。

#### 2. *A. ferrooxidans* による鉱水処理

既に述べたように、鉱水処理には、化学的処理方法と生物学的処理方法がある。化学的処理方法では、中和剤として、消石灰(水酸化カルシウム)、生石灰(酸化カルシウム)、石灰石(炭酸カルシウム)、苛性ソーダ(水酸化ナトリウム)、水酸化マグネシウムなどが用いられる。国内の鉱水処理場の多くは消石灰を用いた中和法を用いており、処理鉱水量の40%を占める。処理量が消石灰中和法に次いで多いのは生石灰中和法である。国内の鉱水の化学的処理の現状については、既に紹介したので参考にさせていただきたい<sup>12)</sup>。

鉱水に含まれる  $\text{Fe}^{2+}$  を化学的に  $\text{Fe}^{3+}$  に酸化するには pH

を中性以上にする必要があり、化学的処理で鉄を除去するためには、多量の中和剤（消石灰や苛性ソーダ）を使用する。しかし、この鉄酸化に鉄酸化細菌 (*A. ferrooxidans*) を用い、生じた  $\text{Fe}^{3+}$  を含む処理水を pH 4~5 に調整することによって、鉄を酸化鉄の沈殿として除去可能である。消石灰や生石灰などを用いて二段階目の中和を行う方法が、鉄酸化細菌・炭酸カルシウム中和法である。この方法は、今井和民岡山大学名誉教授によって開発され、1978年ごろに岡山県の柵原鉱山の鉱水処理に最初に適用された<sup>13)</sup>。1981年には、岩手県の旧松尾鉱山鉱水処理施設にもこの方法が導入され、現在、日本では二処理施設のみがこの方法で鉱水を処理している。多量の  $\text{Fe}^{2+}$  を含む鉱水を大量に処理しないとけないことから、化学的処理法では処理コストが嵩み、中和殿物量も多くなることから、この鉄酸化細菌を用いる方法が導入されている。

### 3. 柵原鉱水処理プロセスの現状

岡山県美咲町の柵原鉱山は、良質の黄鉄鉱を産出する鉱山で、戦後の食糧増産のための肥料（硫酸）の原料となる硫酸の供給に貢献したが、原油から得られる安価な脱硫硫黄からの硫酸の製造が実施されるようになって、平成3年3月に採掘が中止された。鉱山には未採掘の黄鉄鉱が残存しており、それに起因する鉱水が流出する。鉱水の水質は、平成27年度の実績で  $\text{Fe}^{2+}$  を 920 mg/L 含む pH 2.7 の酸性水である。この鉱水処理には、前項で述べたように鉄酸化細菌を用いる方法が日本で最初に開発・導入された<sup>13)</sup>。現在の処理プロセスの概略を Fig. 1 に示した。処理プロセスは、(1) 脱ヒ素工程（苛性ソー

ダで pH を 3.6~3.9 に調整し、バイオフィリックによるヒ素の除去)、(2) 鉄酸化工程 (pH 2.5 付近で鉄酸化細菌による  $\text{Fe}^{2+}$  の  $\text{Fe}^{3+}$  への変換)、(3) 中和工程 (炭酸カルシウムと消石灰による二段中和法)、(4) 殿物処理工程 (フィルタープレスで脱水し、ケーキ状にしたものを殿物貯留場である火の谷ダムに搬送・集積) からなる。平成27年度実績で、年間 88 万  $\text{m}^3$  の鉱水が、Fe 含量 0.02 mg/L、pH 7.4 に除鉄・中和処理されて吉井川に放流されている。

柵原鉱山の鉱水処理プロセスは、鉄酸化細菌として *A. ferrooxidans* を用いて開発されたが、*Ferrovum* 属の鉄酸化細菌も鉄酸化に関与していることが、16S rRNA 遺伝子による酸化槽内の微生物叢の解析によって示唆されている<sup>14-16)</sup>。鉄酸化槽内では鉄酸化細菌によって形成された  $\text{Fe}^{3+}$  から鉄酸化物が生じる結果、酸化槽内の pH は 2.5 付近に低下する。ところが、この低い pH のため、 $\text{Fe}^{3+}$  が完全に酸化物に変換されず、一部可溶性の状態で存在するため、この鉄は消石灰の添加によって「中和殿物」として回収除去されている。

### 4. 柵原鉱水処理プロセスの課題

鉱水処理は、鉱水の生成原因となる鉱石がなくなるまで継続しなければならない。中和に要する経費の削減が最も大きな課題である。中和に要する中和剤の必要量は、放流水質の目標を達成するために必要な中和剤の量であり、この量は原水の水素イオン濃度と金属総含有量によって決定される。鉄酸化細菌を用いる処理方法では、通常、鉄酸化処理工程と中和処理工程の二つの工程が用いられている。鉄酸化処理工程は、細菌 (*A. ferrooxidans*) の生育に最適な pH 2.5 付近で稼働され、中和処理工程では、炭酸カルシウムで pH を 4~5 にすることによって、鉄の除去と共沈による亜鉛やマンガン除去が行われた後、さらに pH 7.5 に中和処理が施されている。

柵原鉱山鉱水処理場では、平成24年に設備の更新が行われた。この際、従来の鉄酸化工程の前にヒ素除去工程が導入され、鉱水からのヒ素の除去が pH 3.6 付近で行われている。この処理槽の設置により、鉄酸化槽で処理する鉱水の pH は 3.6 付近に調整されたにも関わらず、鉄酸化処理は pH 2.5 付近で実施されている。鉄酸化処理工程に流入する鉱水の pH が 3.6 付近であるため、その pH を下げることなく鉄を酸化処理することができれば、その後の中和処理に要する中和剤の経費の削減が期待できる。

現在の鉱水処理プロセスでは、鉄酸化工程で生成した酸化鉄を硫酸と反応させて製造したバイオフィリックが脱ヒ素処理に使用されている。鉄酸化細菌は、 $\text{Fe}^{3+}$  をヒ素吸着能があるシュベルトマナイト [ $\text{Fe}_8\text{O}_8(\text{OH})_6(\text{SO}_4) \cdot n\text{H}_2\text{O}$ ] という鉄酸化物に変換できる。鉄酸化細菌によるシュベルトマナイト生成の最適な pH は 3.5 付近であると報告されており<sup>17)</sup>、pH 2.5 付近で稼働している

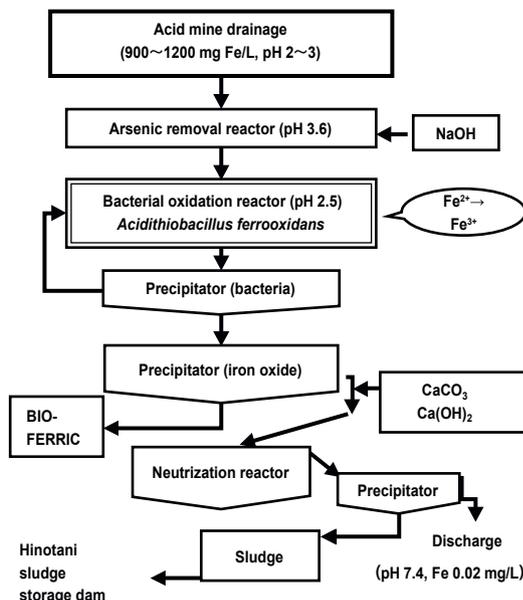


Fig. 1 Process flow diagram of the biological AMD treatment plant in Yanahara mine.

鉄酸化処理槽でのシュベルトマナイト生成効率は良くない。pH 2.5付近で鉄酸化処理した処理水には可溶性  $\text{Fe}^{3+}$  が含まれているため、中和処理工程で炭酸カルシウムと消石灰による化学的処理によって酸化鉄の沈殿物（中和殿物）として除去されている。この中和殿物は、再利用が難しいため、柵原鉱山の近くのダムに貯留されているが、ダムの容量にも限界があるため、新たなダムの建設も検討しないといけな状況である。そこで、微生物酸化処理を pH 3.5付近で稼働させることによって、中和に要するコスト低減と鉄酸化槽で  $\text{Fe}^{2+}$  を資源として利用可能な鉄酸化物（シュベルトマナイト）に変換し、中和殿物生成量の少ない鉱水処理プロセスの構築を目指すこととした。

### 5. 鉱水処理に利用可能な中等度好酸性鉄酸化細菌の探索

現在、柵原の鉱水処理プロセスの鉄酸化処理槽では、*A. ferrooxidans* や *Ferrovum* 属の鉄酸化細菌が検出される。pH 3～4 付近で鉄を酸化して生育する鉄酸化細菌を分離して、鉄酸化試験に用いた報告はないため、柵原鉱山近辺の休石地区にある柵原鉱山とは別系統の鉱脈に起因する坑水を試料として、pH 3～4 でよく増殖する鉄酸化細菌の探索が行われた<sup>16)</sup>。この鉱水は、pH 4.2、鉄濃度は 51 mg/L で、柵原鉱山からの鉱水（pH 2.5、鉄濃度

900～1200 mg/L）に比べて、鉄濃度が極端に低かった。褐色の鉄酸化物が沈殿していることから、鉄酸化細菌の存在が示唆されたため、分子生物学的方法を用いた微生物叢の解析が行われた結果、鉄酸化細菌として近年その存在が明らかにされ、pH 3 で最もよく生育することが報告されている *Ferrovum myxofaciens* に近縁の細菌が検出された<sup>18)</sup>。また、*Gallionella capsiferiformans* に近縁な細菌も検出された。*Gallionella* 属の細菌は、微好気性の中性域環境で鉄を酸化する細菌として報告されていたが、中等度酸性環境にも近縁の細菌が存在することが明らかとなった<sup>16)</sup>。

*A. ferrooxidans* とは異なる鉄酸化細菌が検出された洞窟の試料を用いて微生物の単離が試みられた<sup>1,19)</sup>。鉄酸化細菌の単離にはアガロース二重層固体培地法が用いられた。その結果、二種類の鉄酸化細菌（YCN-1 と YCN-2）が単離されている。YCN-1 の最適増殖 pH は 3 で、20 mM  $\text{FeSO}_4$  存在下で  $2.5 \times 10^7$  cells/mL の増殖量を示した。YCN-2 の最適増殖 pH は 3.5 で、 $5.4 \times 10^7$  cells/mL の増殖量を示した。YCN-2 は YCN-1 に比べて、増殖し始めるまでに時間を要したが、増殖量は YCN-1 よりも多かった。

16S rRNA 遺伝子による同定の結果、YCN-1 は、*Ferrovum* 属細菌に近縁の鉄酸化細菌で、これまでに単

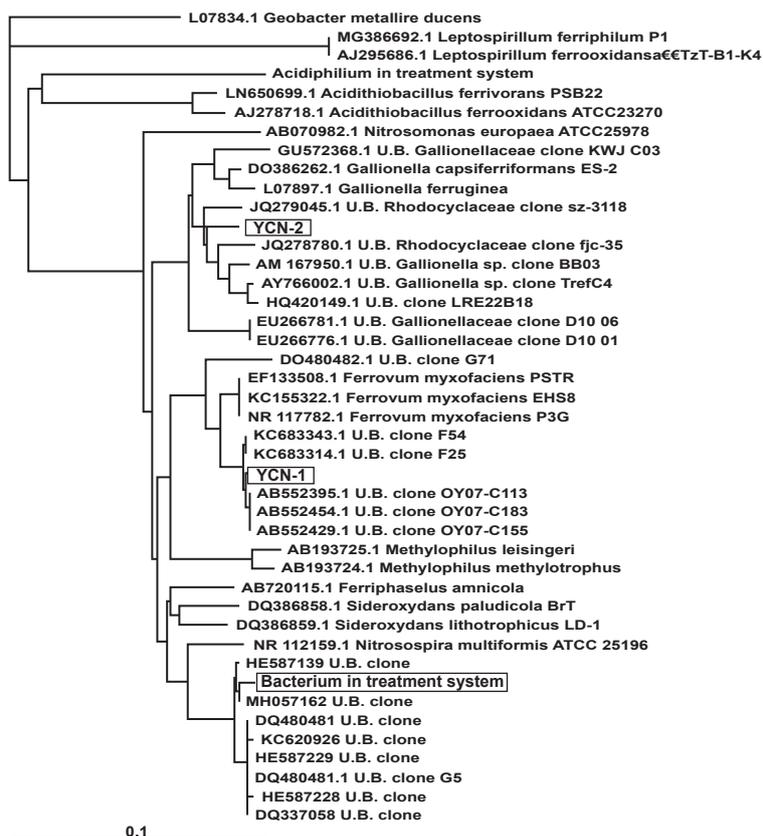


Fig. 2 Phylogenetic tree based on 16S rRNA gene sequence showing the positions of YCN-1, YCN-2, and Bacterium in treatment system.

離されたことのない新規な鉄酸化細菌であった (Fig. 2)。一方、YCN-2 は、*Gallionella* 属の鉄酸化細菌と推定され、近縁の細菌は遺伝子のみ報告されていたもので、この細菌も初めて単離された鉄酸化細菌であった。

新たに開発する処理プロセスでは、有効利用可能なシュベルトマナイトの効率的な生産と中和産物生成量の減量化も目指している。単離した細菌 (YCN-1 と YCN-2) が生成した鉄酸化物を X線回析法で分析した結果、いずれの沈殿物も低結晶性ではあるが、シュベルトマナイトが検出された。従って、新たに単離した鉄酸化細菌は、鉱水からのシュベルトマナイト生成に使用可能であると判断された。以上の研究成果から、柵原鉱水処理プロセスの鉄酸化処理を脱ヒ素工程の pH 3.5 付近で行っても十分な鉄酸化が可能で、鉱水に含まれる鉄をシュベルトマナイトなど利用可能な酸化鉄に効率的に変換できると考えられた。

#### 6. 単離した鉄酸化細菌による鉄酸化試験

鉱水の処理実験の最初の段階として、単離した鉄酸化細菌を用いた試験を実施した。YCN-1 株は、鉱水から単離した *Ferrovum* 属の鉄酸化細菌で、最適な増殖 pH を 3 付近に持っている。20 mM  $\text{FeSO}_4$  を含む YANA 培地 (柵原の鉱水の化学組成を基に作成した人工培地) で培養した YCN-1 株を  $6 \times 10^8$  cells/mL になるように添加し、pH 3.5 の YANA 培地を反応槽内の滞留時間 (HRT; hydraulic retention time) が 8 時間で 24 時間通水した。その結果、 $\text{Fe}^{2+}$  は完全に酸化されたが、ジャーファメンター内の pH が 2.5 に低下し、試験後の処理槽内の細菌濃度が  $8.9 \times 10^7$  cells/mL に低下した。HRT を 4 時間にしたところ、YANA 培地通水後 5 時間で、ジャーファメンター内の  $\text{Fe}^{2+}$  の濃度が 10 mM に増加し、 $\text{Fe}^{2+}$  を酸化することができなかった。YCN-1 の鉄酸化活性の最適 pH

は 3 付近であるため、ジャーファメンター内の pH の低下によって十分な鉄酸化活性が発揮されなかったものと考えられた。また、YCN-1 で鉱水の鉄を酸化するためには、高濃度の細胞が必要であることが明らかになった。

#### 7. 鉱水中の鉄酸化細菌による柵原鉱水の鉄酸化試験

pH 制御しない場合には鉄酸化槽の pH が鉄酸化物の生成に伴って低下する。この現象は、現在の柵原の鉱水処理プロセスでも同様に生じているため、増殖と鉄酸化活性の最適 pH を 3.5 付近に持つ鉄酸化細菌を鉄酸化槽内で維持することができない。また、単離した YCN-1 株を用いた鉄酸化実験では、鉄の酸化に高濃度の細胞が必要であった。YCN-1 を用いて、pH を 3.5 に維持した条件下で鉄酸化活性を評価していないが、YCN-1 の鉄酸化能は *A. ferrooxidans* より低いため、酸化槽の鉄酸化活性を維持するためには、*A. ferrooxidans* の約 10 倍の菌体が必要であること示唆されていた。柵原近辺の pH 4 付近の酸性鉱山廃水は、柵原鉱水処理場に導入されて処理されているため、鉱水の中には pH 3.5 付近に最適な増殖 pH を持つ YCN-1 以外の鉄酸化細菌も含まれていることが期待される。そこで、鉱水に含まれる鉄酸化細菌をそのまま利用することとし、Fig. 3 に示したジャーファメンターを用いた鉄酸化試験を行った。20 mM  $\text{FeSO}_4$  を添加した pH 3.5 の YANA 培地に柵原の鉱水を 1/20 容量添加し、pH を 3.5 に維持しながら培養した結果、鉄の酸化が観察された。培養液の鉄が完全に酸化された後、20 mM  $\text{FeSO}_4$  を添加した YANA 培地を通水する鉄酸化試験を実施した。鉄酸化処理槽の pH を 3.5 に維持して試験を行った結果を Table 1 に示した。HRT を 7.0~7.4 時間で通水した試験では、処理槽に通水した YANA 培地の  $\text{Fe}^{2+}$  を完全に酸化することができた。処理槽内の細菌数は、前項の実験で用いた YCN-1 株の場合より 1 桁低

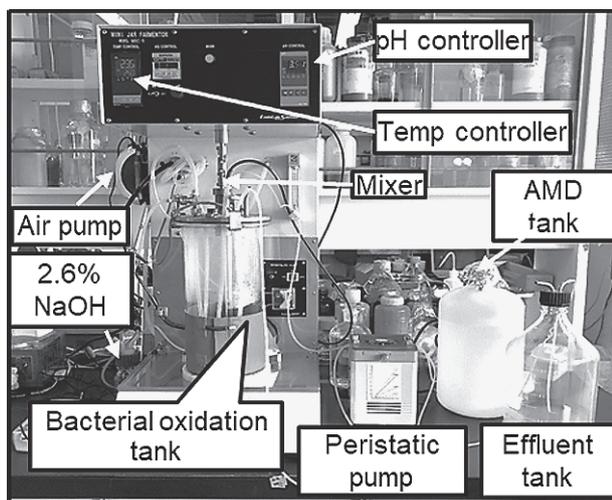


Fig. 3 Jar fermenter for the AMD treatment experiments using iron-oxidizing bacteria.

Table 1 Time course changes of  $\text{Fe}^{2+}$  and cell concentrations in effluents from the iron-oxidation reactor operated under HRT of 7.0-7.5 h (A) or 5.3-5.6 h (B)

(A) HRT = 7.0-7.5 h

Treatment period (h)	$\text{Fe}^{2+}$ concentration (mM)	Cell concentration ( $10^7$ cells/mL)
0	0	2.44
5	0.92	1.81
24	0	2.19

(B) HRT = 5.3-5.6 h

Treatment period (h)	$\text{Fe}^{2+}$ concentration (mM)	Cell concentration ( $10^7$ cells/mL)
0	0	3.0
6	7.2	2.37
24	9.7	0.78

いにもかかわらず、高い鉄酸化活性が認められた。HRTを5.3~5.6時間にした場合には、処理槽内の $Fe^{2+}$ が徐々に増加するとともに、24時間後の処理槽内の細菌細胞数が減少した。このことは、鉄の酸化能の維持には、ある濃度以上の鉄酸化菌が必要で、流出した鉄酸化物に付着した鉄酸化細菌を鉄酸化処理槽に戻すこと（返泥）が必要であると考えられた。

上述のように、鉱水を接種したYANA培地のpHを3.5に維持しながら培養することによって鉄酸化細菌の増殖が認められたので、YANA培地の代わりに鉱水を用いて試験を行った。柵原の鉱水の成分分析の結果、細菌の増殖に必要な窒素源とリン源がほとんどないため、鉱水には $NH_4H_2PO_4$ を1 mMになるように添加したものを処理水として用いた。その結果、培養2日後から鉄の酸化が観察され、4日後には鉱水中の $Fe^{2+}$ が完全に酸化された。鉄酸化細菌の増殖によって鉄が酸化されたものと推測されたため、処理液から抽出したDNAを用いて、次世代シーケンサーで微生物叢の解析を行った。同定を行った結果をTable 2に示した。微生物種は比較的単純で、84.5%が*Nitrosospira*に属する細菌であった。データを示していないが、YANA培地を用いて鉱水中の微生物を増殖させた際には、鉄酸化細菌である*Gallionella*属の細菌が優勢な細菌種として検出された(約49%)。 *Nitrosospira*属の細菌も検出されたが、その割合は15%程度と低かったため、鉄を酸化している微生物は*Gallionella*属細菌と推測された。しかし、鉱水をそのまま用いた鉄酸化試験では、鉄酸化細菌と推測される*Gallionella*属細菌は微生物種として検出されなかった。Table 2のランク9 (iron-oxidizing acidophile) は鉄酸化細菌と推測されるが、わ

**Table 2** Taxonomic composition of bacterial community in the iron oxidation reactor treating AMD from Yanahara mine and operated at pH 3.5

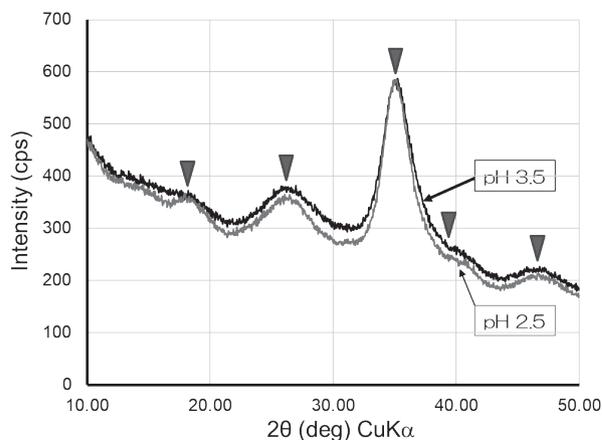
Rank	Genus	%	Accession
1	<i>Nitrosospira</i>	84.48	
2	<i>Acidiphilium</i>	11.17	
3	<i>Alcaligenaceae</i>	1.24	
4	<i>Rhodanobacter</i>	0.99	AJ318146.1
5	<i>Acidocella</i>	0.69	EF087979.1
6	<i>Thiomonas cuprina</i>	0.66	NR_041628.1
7	<i>Stramenopiles</i>	0.32	
8	Betaproteobacteria	0.13	
9	Iron-oxidizing acidophile	0.1	AY040739.1
10	<i>Burkholderiales</i>	0.07	

The V3-V4 hypervariable region of the 16S rRNA gene was amplified from DNA extracted from sample of the iron oxidation reactor. The PCR product was sequenced with an Illumina MiSeq sequencer. When the species identification was not possible, classification was made at the genus level, the family level, the order level or the class level.

ずか0.1%の細菌が処理槽内の鉄酸化活性を維持しているとは考えづらいため、*Nitrosospira*属の細菌が鉄酸化に関与していることが強く示唆された。相同性解析の結果 (Fig. 2), 相同性のある細菌の遺伝子は世界各地の鉱水から検出されているが、培養困難な細菌とされており、その性質は不明である。

## 8. 鉄酸化物の分析

既に述べたように、新たに開発する処理プロセスでは、有効利用可能なシュベルトマナイトの効率的な生産と中和殿物生成量の減量化も目指している。鉱水に含まれている鉄酸化細菌を用いたジャーファメンター試験で形成された鉄酸化物の沈降性は非常に高く、凝集剤なしですみやかに沈降した。形成された鉄酸化物をX線回析法で分析した結果、Fig. 4に示したようにシュベルトマナイトのみであった。従って、pH 3.5で生育する鉱水中の鉄酸化細菌を用いて、効率よくシュベルトマナイト生成が可能であることが明らかとなった。また、Fig. 5に示したように、処理水を静置したときの上清は透明で、現行



**Fig. 4** X-ray diffraction patterns of precipitates from the bacterial oxidation tank operated at pH 2.5 and 3.5.

Arrow heads indicate typical signals for schwertmannite.



**Fig. 5** Solutions from the bacterial oxidation reactors operated at pH 2.5 and 3.5.

プロセスの pH 2.5での鉄酸化処理水と異なり、可溶性の  $\text{Fe}^{3+}$  は含まれていないことが予想された。pH 2.5の現行の処理では可溶性の  $\text{Fe}^{3+}$  が中和殿物の生成の要因となっているが、pH 3.5の鉄酸化処理では酸化鉄からなる中和殿物が生じないことが期待された。

### 9. 試作した装置による鉱水処理試験

ジャーファメンターを用いた試験で、鉱水を pH 3.5で通気攪拌することによって、鉄の酸化が確認できたので、柵原鉱水処理場に設置した鉱水処理試験装置 (Fig. 6) を用いて、鉱水処理試験を行った。柵原鉱水処理場のヒ素処理後の鉱水 (680 mg Fe/L) を酸化槽に注入し、pH を3.5に維持しながら通気攪拌した結果、可溶性の Fe が3日後に10 mg/L 以下 (河川にそのまま放流できる鉄濃度) となった。この時点で HRT が10時間になるように酸化槽に鉱水を注入し、pH を12%苛性ソーダで3.5に維持しながら鉄酸化試験を行った。なお、窒素・リン源として  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$  を1 mM になるように添加した。HRT が10時間では鉄を酸化できたが、HRT を8時間にすると、鉄を完全に酸化できなかった。柵原の処理プロセスでは、バクテリア回収シクナーから、鉄酸化物である「泥」を酸化槽に返送させながら運転している。HRT が10時間の時の酸化槽内の沈殿物 (泥) を SV60 (処理水100 mL を60分間静置したときに生じる沈殿物の容量) で測定した結果、約1%であった。泥には鉄酸化細菌が付着しているため、鉄酸化槽内の泥量は鉄酸化能に影響する。そこで、酸化槽内の泥量を増加させて、酸化試験を実施することとした。返泥用ポンプを用いて、酸化槽内の泥の量を SV60 で約30%に増加させた。返泥用ポンプの性能のため、ポンプ流量を最大限にしないと輸送管が閉塞したため、返泥量は約290 mL/min で固定運転した。酸化

槽に流入するヒ素処理水 (Fe 濃度は実験期間中に680~930 mg/L の範囲で変動) の流入量を増加させて、HRT を小さくしながら試験を行った。その結果、酸化槽内の SV60は約15%で安定化し、Fig. 7に示すようにヒ素処理鉱水の流入量428 mL/min (処理槽の容量に対して HRT が2時間) でも酸化槽内の可溶性の鉄濃度を10 mg/L 以下 (河川に放流可能な濃度以下) に維持しながら連続運転が可能となった (Fig. 7)。

処理水を分析した結果を Table 3 に示した。鉄の除去は行われていたが、砒素処理水に含まれていた銅、亜鉛、マンガンの含量を減少させることができなかった。特に亜鉛は、放流可能な濃度 (10 mg/L) を超えているため、この除去のための方策を考える必要がある。

### おわりに

微生物を用いて酸性条件下で鉄を酸化する方法は、化学的な鉄酸化方法と比較して安価である。柵原の鉱水の

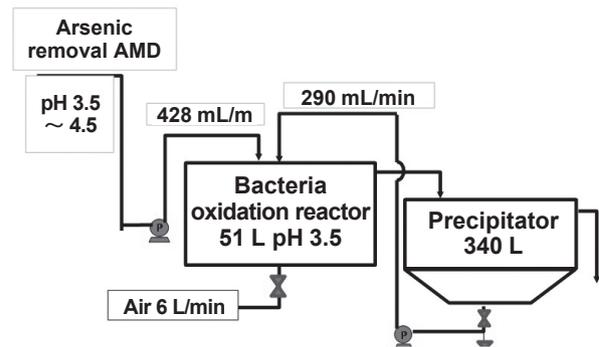


Fig. 7 Continuous treatment of arsenic removal AMD in the pilot-scale reactor using iron-oxidizing bacteria.

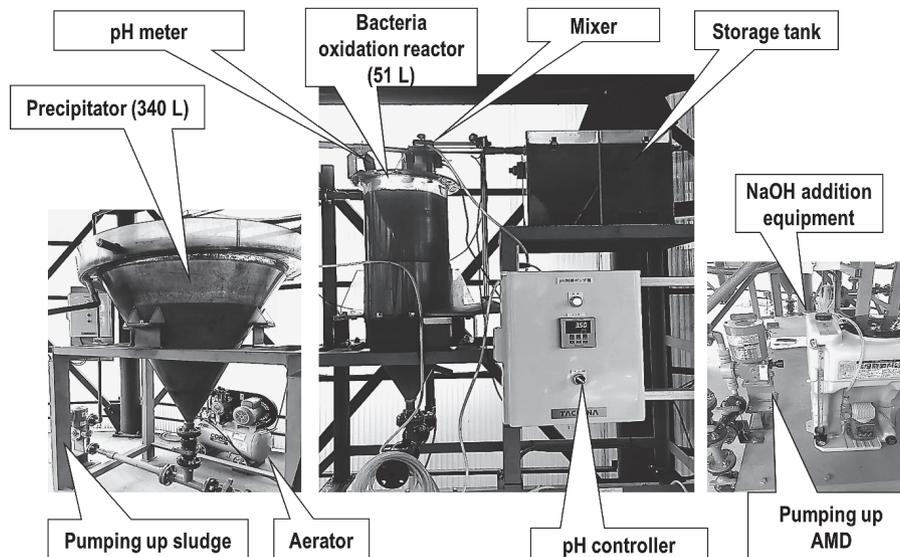


Fig. 6 Pilot-scale reactor for the biological AMD treatment experiments.

微生物処理には、プロセスの維持管理に都合の良い pH 2~3 で増殖する鉄酸化細菌である *A. ferrooxidans* が導入された。この鉄酸化細菌は、開発から約40年経過した今も鉱水を処理し続けている。しかし、この処理方法では、再利用が難しい中和殿物の生成量が多いため、その減量化が強求められていた。現行のプロセスで生成される中和殿物は、鉄酸化処理水に残存する可溶性の  $Fe^{3+}$  に起因する。開発したプロセスでは、鉄酸化槽内で処理水中の鉄をほぼ完全に鉄酸化物に変換できるため、鉄酸化処理液に溶存性の  $Fe^{3+}$  が存在していない。このことは、現行のプロセスで実施されている残存鉄の中和沈殿処理工程が不要であることを意味している。また、鉄酸化処理水中の鉄酸化物の沈降性が非常に高いため、鉄酸化物の沈殿除去に現行のプロセスで使用されている 1 ppm の凝集剤の添加を必要としない。柵原の処理プロセスでは、鉄酸化細菌によって鉄酸化工程で生成される鉄酸化物であるシュベルトマナイトの利用が検討されている。開発したプロセスでの鉄酸化物の分析は現在進行中だが、ジャーファメンター試験では、これまでのプロセス同様、シュベルトマナイトが生成していることから、資源の有効利用の面からも期待される。

開発したプロセスの現時点での処理能力を、ヒ素処理水の酸化槽内への流入量と沈殿槽から酸化槽への返泥量を加算して算出すると、酸化槽内での鉱水の HRT は1.17

時間である。この値は、現行の処理プロセスの HRT よりも小さい値で、高い鉄酸化能を持つ鉱水処理プロセスが構築できたことになる。処理コストの試算に必要なものである、酸化槽の pH を維持するために必要な苛性ソーダの消費量の見積、沈殿物の生成量と成分分析等を現在行っているが、当初の目標である、処理コストの低減化、中和殿物の減量化、利用可能な鉄酸化物の効率的生成が可能な鉱水処理プロセスが構築できると考えている。

応用微生物学の研究者である我々の最も重要な使命は、有用な微生物の探索とその機能の利用である。そのためには微生物を単離しその性質を明らかにすることが欠かせない。本研究で、高い鉄酸化能を持つ微生物による鉱水処理プロセスの開発のめどが立ったが、残念ながら主役の微生物の正体を明らかにする課題が残されている。

### 謝 辞

本研究は、岡山大学名誉教授杉尾 剛氏、岡山大学名誉教授高田 潤氏のご指導とご協力を得て、岡山大学農学部生物機能・遺伝資源開発学講座微生物機能開発学研究室、生物機能開発学講座微生物機能開発学研究室、農芸化学コース微生物機能学研究室に在籍した大学院学生、学部学生諸氏によって実施された。本論文に記載した研究の一部は、一般財団法人日本鉱業振興会からの研究助成金および DOWA ホールディングとの共同研究 (DOWA テクノファン) によって実施されました。鉱水の微生物分析と新たな鉱水処理プロセスの開発試験では、卯根倉鉱業西部事業所の稲谷博征氏、赤堀文雄氏から多大なご協力とご助言を賜りました。ここに記して深謝いたします。

### 引用文献

- 1) Ilbert, M. and V. Bonnefoy : Insight into the evolution of the iron oxidation pathways. *Biochim. Biophys. Acta.*, **1827**, 161-175 (2013)
- 2) Kamimura, K., S. Fujii and T. Sugio : Purification and some properties of ubiquinol oxidase from obligately chemolithotrophic iron-oxidizing bacterium, *Thiobacillus ferrooxidans* NASF-1. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **65**, 63-71 (2001)
- 3) Wakai, S., M. Kikumoto, T. Kanao and T. Kamimura K : Involvement of sulfide:quinone oxidoreductase in sulfur oxidation of an acidophilic iron-oxidizing bacterium, *Acidithiobacillus ferrooxidans* NASF-1. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **68**, 2519-2528 (2004)
- 4) Kanao, T., K. Kamimura and T. Sugio : Identification of a gene encoding a tetrathionate hydrolase in *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *J. Biotechnol.*, **132**, 16-22 (2007)
- 5) Kanao, T., C. Matsumoto, K. Shiraga, K. Yoshida, J. Takada and K. Kamimura : Recombinant tetrathionate hydrolase from *Acidithiobacillus ferrooxidans* requires exposure to acidic conditions for proper folding. *FEMS Microbiol. Lett.*, **309**, 43-47 (2010)
- 6) Kikumoto, M., S. Nogami, T. Kanao, J. Takada and K. Kamimura : Tetrathionate-forming thiosulfate dehydrogenase from the acidophilic, chemolithoautotrophic bacterium *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **79**, 113-120 (2013)
- 7) Kanao, T., M. Kosaka, K. Yoshida, H. Nakayama, T. Tamada,

**Table 3** Water chemistry of AMD from Yanahara mine before and after the biological treatment at pH 3.5

Parameter	Unit	Arsenic removal	
		AMD	Bacterial oxidation AMD
pH	—	3.7	3.8
Cd	mg/L	0.04	0.02
Pb	mg/L	ND	ND
Total Cr	mg/L	0.01	ND
Cr(VI)	mg/L	ND	ND
Cu	mg/L	1.9	1.2
Zn	mg/L	17	16
Ca	mg/L	35	35
Total Fe	mg/L	890	2.2
Soluble Mn	mg/L	5.9	5.9
As	mg/L	ND	ND
B	mg/L	0.37	0.29
F	mg/L	ND	0.42
Se	mg/L	ND	ND
Suspended solid	mg/L	11	3.1
Na	mg/L	260	870
NH <sub>3</sub> -N	mg/L	0.06	1.1
NO <sub>3</sub> -N	mg/L	1.1	0.18
PO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	mg/L	0.05	ND

ND, Not Detected

- R. Kuroki, H. Yamada, J. Takada and K. Kamimura K : Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of tetrathionate hydrolase from *Acidithiobacillus ferrooxidans*. Acta Crystallogr. Sect. F Struct. Biol. Cryst. Commun., **69**, 692-694 (2013)
- 8) Kanao, T., H. Nakayama, M. Kato and K. Kamimura : The sole cysteine residue (Cys301) of tetrathionate hydrolase from *Acidithiobacillus ferrooxidans* does not play a role in enzyme activity. Biosci. Biotechnol. Biochem., **78**, 2030-2035 (2014)
- 9) 上村一雄・金尾忠芳：鉄酸化細菌：その多様な鉄・硫黄代謝. 生物工学会誌, **92**, 315-319 (2014)
- 10) 上村一雄・金尾忠芳：微生物を用いる湿式冶金 —— バイオリーチング ——. 生物工学会誌, **95**, 662-666 (2017)
- 11) 上村一雄：鉄や硫黄を食べる微生物. 微生物増殖学の現在・未来. pp. 427-444, 地人書館, 東京 (2008)
- 12) 上村一雄・金尾忠芳・赤堀文雄・稲谷博征：微生物を用いた酸性鉱山廃水(鉱水)処理の現状と課題. 鉱山, **764**, 31-39 (2018)
- 13) 今井和民：独立栄養細菌. 化学同人, 東京 (1984)
- 14) Okabayashi, A., S. Wakai, T. Kanao, T. Sugio and K. Kamimura : Diversity of 16S ribosomal DNA-defined bacterial population in acid rock drainage from Japanese pyrite mine. J. Biosci. Bioeng., **100**, 644-652 (2005)
- 15) Kamimura, K., A. Okabayashi, M. Kikumoto, M. A. Manchur, S. Wakai and T. Kanao : Analysis of iron- and sulfur-oxidizing bacteria in a treatment plant of acid rock drainage from a Japanese pyrite mine by use of ribulose-1, 5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large-subunit gene. J. Biosci. Bioeng., **109**, 244-248 (2010)
- 16) Wang, Y., T. Yasuda, S. Sharmin, T. Kanao and K. Kamimura : Analysis of the microbial community in moderately acidic drainage from the Yanahara pyrite mine in Japan. Biosci. Biotechnol. Biochem., **78**, 1274-1282 (2014)
- 17) 伊藤健一・福士圭介・橋本晃一・田中小満・池田穂高・佐藤 努・米田哲朗：自然浄化機構に学ぶ新しい資源回収型酸性坑廃水処理方法の開発. J. MMIJ, **24**, 519-528 (2008)
- 18) Johnson DB, et al. Uncovering a microbial enigma : isolation and characterization of the streamer-generating, iron-oxidizing, acidophilic bacterium "*Ferroplasma myxofaciens*". Appl. Environ. Microbiol., **80**, 672-680 (2014)
- 19) 上村一雄・金尾忠芳・赤堀文雄：酸性鉱山廃水処理プロセスの低コスト化に関する研究. 日本鉱業振興会助成 研究成果報告書, pp.25-28 (2017)