



---

黄銅鉱のバクテリアリーチングに及ぼす窒素固定菌の共生の影響

(研究課題番号06651090)

---

平成7年度科学研究費補助金(一般(C))

研究成果報告書

平成8年3月

---

研究代表者 中澤 廣

(岩手大学工学部)

---

## はしがき

鉄酸化細菌 (*Thiobacillus ferrooxidans*) をもちいた黄銅鉱のバクテリアリーチングにおいて、バクテリアの増殖に伴い、バクテリア自身の代謝産物 (排出物) の蓄積によりその増殖阻害がおこり、黄銅鉱の浸出が阻害されることが考えられる。本研究は、バクテリアの代謝産物を除去するため、生物的除法として、比較的酸性領域でも生育が可能な窒素固定菌による分解・消化法、物理化学的な方法として活性炭による吸着除去をとりあげ、黄銅鉱浮選精鉱のバクテリアリーチングの促進について検討するため、文部省科学研究費補助金により行われたものである。

### 研究組織

研究代表者： 中澤 廣 (岩手大学工学部・教授)

### 研究経費

平成6年度	13000千円
平成7年度	6000千円
計	19000千円

### 研究発表

#### (1) 口頭発表

藤澤寿志・中澤廣・佐藤敏人：黄銅鉱のバイオリーチングに及ぼす活性炭の影響、平成8年度資源・素材学会春季大会、No. 3712、3月31日発表予定  
(1996)

## 1. 緒 言

鉄酸化細菌 (*T. ferrooxidans*) を用いた黄銅鉱の浮選精鉱のバクテリアリーチングが検討されており、初期段階において浸出速度が速いが、徐々に浸出速度が低下し、銅が十分溶出しないことが報告されている。この原因として、鉱物の酸化にともなう鉱物表面での硫黄の蓄積やジャロサイトの生成等のほかに、バクテリアの代謝産物（排出物）の蓄積による増殖阻害が考えられている。自然界においては、他の微生物の代謝産物を栄養源として有効に利用できる微生物が生息し、微生物間に共生関係が成り立っている場合が多い。本研究では、窒素固定菌をとりあげ、窒素固定菌により鉄酸化細菌の代謝産物を分解・消化させ、黄銅鉱浮選精鉱のバクテリアリーチングの促進について検討を行った。また、活性炭は有機イオンを吸着することが知られており、活性炭によるバクテリアの代謝産物の除去が可能と考えられる。そこで、黄銅鉱のバクテリアリーチングに及ぼす活性炭の影響についても検討した。

## 2. 試料および実験方法

実験に用いた試料は花岡鉱業㈱より提供していただいたものである。その主要鉱物は黄銅鉱であり、その他の鉱物として閃亜鉛鉱、方鉛鉱、黄鉄鉱を含み、化学分析値はCu:20.39%、Fe:30.22%、Zn:4.98%、Pb:4.46%であった。

実験に用いた鉄酸化細菌 (*Thiobacillus ferrooxidans*) は、旧松尾鉱山新中和処理施設酸化槽より処理水を採取し、 $Fe^{2+}$ を基質としたシリカゲル平板法<sup>1)</sup>により単離し、9K培地<sup>2)</sup>で数回回分培養したものである。前培養は、次のように行った。この菌を9K培地で培養し、 $Fe^{2+}$ の酸化が80%以上進行した時点で、No.2ろ紙でろ過し、ろ液中の菌を遠心分離 (14000rpm、4℃、30分) により濃縮した。洗浄の目的でこの濃縮した菌をpH1.5の硫酸溶液に加え、上述の条件で遠心分離し、再び、濃縮した。

窒素固定菌として、東京大学応用微生物研究所微生物微細藻類総合センターより提供していただいた *Beijerinckia indica* (ATCC9540) を用いた。用いた培地の組成は次のようである； $K_2HPO_4$  0.5g/l、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.2g/l、 $CaCl_2$  0.1g/l、 $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$  0.0005g/l、 $FeCl_3$  0.005g/l、酵母エキス 0.5g/l、サッカロース 2.5g/l、寒天 15.0g/l。この培地を用いて前培養を行い、遠心分離 (14000rpm、4℃、30分) により濃縮し、実験に用いた。

黄銅鉱の浸出実験は次のように行った。300mlの三角フラスコに所定のpHに調節した9K培地 (硫酸第一鉄なし)、黄銅鉱精鉱4g、菌濃縮液および実験によっては活性炭を加えて200mlとし、シリコ栓をして、130rpm、振幅30mm、約25℃の条件で振盪攪拌した。所定時間ごとに、浸出液のpHと酸化還元電位を測定し、浸出液を5ml抜き取り、No.5Cろ紙でろ過し、ろ液のpHおよび各金属イオン濃度を測定した。抜き取りあるいは蒸発による減量分は同量

の培地を加え補った。Cu、Zn濃度は原子吸光法、Fe濃度はオ－フェナントロリン吸光光度法により測定した。菌体濃度は、600倍顕微鏡下でエルマ計数盤を用いて測定した。初期菌体濃度は、 $7 \times 10^7 \sim 1 \times 10^8$  cells/mlで行った。

*T. ferrooxidans*の鉄酸化活性におよぼす活性炭の影響について検討するため、次のような酸化実験を行った。Fe<sup>2+</sup>濃度22.9g/lの9K培地に所定量の活性炭を加え、振盪攪拌し、所定時間毎に過マンガン酸カリウム滴定法によりFe<sup>2+</sup>濃度を測定し、Fe<sup>2+</sup>酸化率を求めた。

用いた試薬はいずれも市販の特級試薬である。活性炭は関東化学株式会社製（Lot No. 002R3065）のものを粉碎、整粒して用いた。

### 3. 実験結果および考察

*Beijerinckia indica*は、酸性領域でも生育が可能であるが、一般にバクテリアリーチングが行われる強酸性領域における生育について検討を行う必要がある。そこで、まず、バクテリアリーチングの最適pHを求めるため、*T. ferrooxidans*による黄銅鉱のバクテリアリーチングにおよぼす初期pHの影響について検討した。その結果を図1に示した。Cuの浸出率は、初期pHが1.7の場合が最も高く、pHが初期pHが2.0～3.0では、30日後の浸出率に差が認められなかった。pHの経時変化については、初期pHが1.7以上でははじめpHは増加し、その後低下する傾向が認められた。初期pHが3.0の場合でも、5日目からpHは3.0以下に低下し、30日目ではpHは2.5まで低下した。

初期pHを3.0、2.5、2.0に設定して、*Beijerinckia indica*の生育に及ぼすpHの影響について検討した。初期pHの場合は、ある程度の増殖は確認できたが、初期pHが2.5、2.0でほとんど増殖しなかった。このため、pHを3.0にし、約1ヶ月培養後、pHを2.9に調節した培地に植継ぐ操作を繰り返し行い馴養を試みたが、pH3.0以下では増殖しなかった。そこで、初期pHを3.0とし、*T. ferrooxidans*と*Beijerinckia indica*の約1:1の混合菌を用いて、黄銅鉱のバクテリアリーチングを行った。その結果を図2に示した。*T. ferrooxidans*単独の場合も示したが、両者のCu浸出率に差がみられず、窒素固定菌の効果は認められなかった。今回は、*Beijerinckia indica*しか入手できず、他の窒素固定菌について検討できなかった。今後、強酸性領域で生育できる従属栄養細菌の探索が必要である。

次に、バクテリアリーチング過程で蓄積する*T. ferrooxidans*の排出物を除去するため、活性炭を添加して、黄銅鉱のバクテリアリーチングについて検討した。

図3は、-400meshの活性炭を1g添加しておこなったバクテリアリーチングの結果を示したものである。参考のため、活性炭を添加しなかった場合についても示した。活性炭無添加の場合は、バクテリアリーチング35日間後のCu浸出率は10%であるが、活性炭を添加した場合は55%溶出しており、活性炭の添加によりCuの浸出が著しく促進された。

図4、図5は、種々の粒度の活性炭を1g添加しておこなったバクテリアリーチングの結

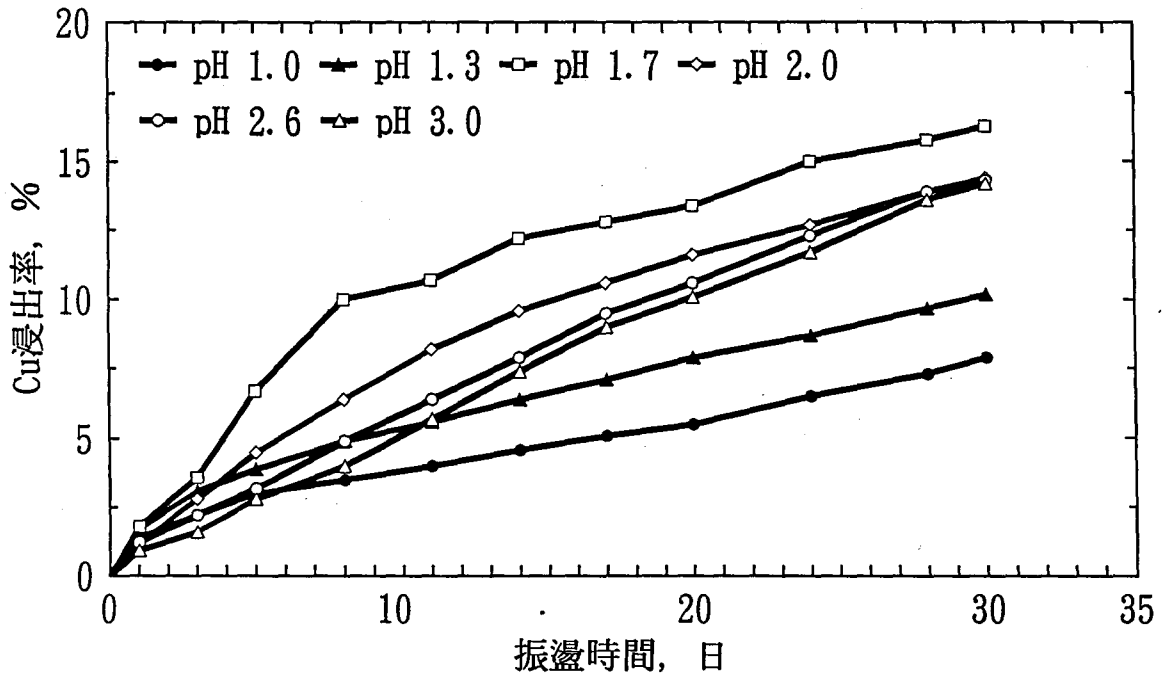
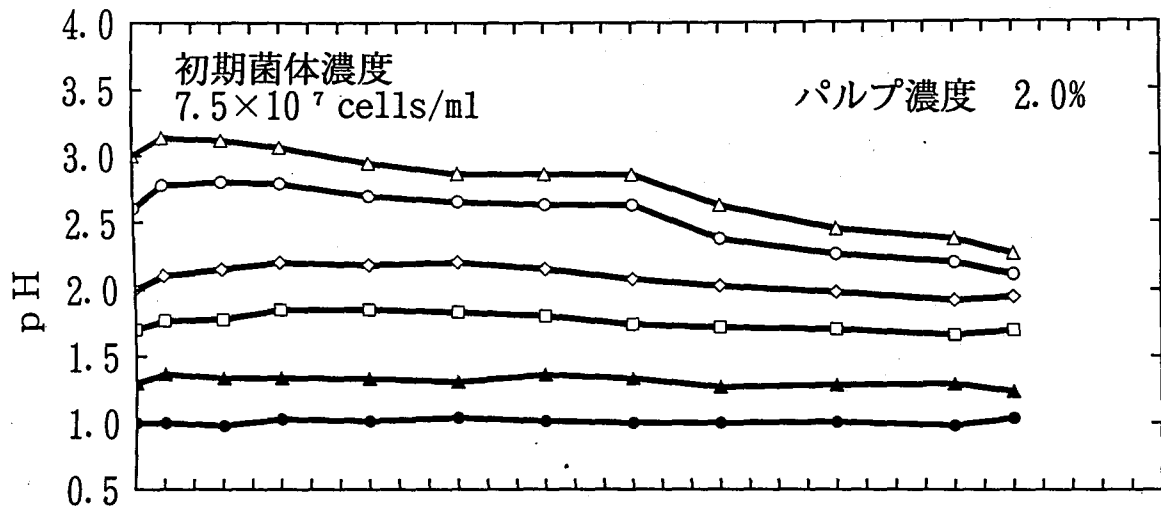


図1 黄銅鉱のバクテリアリーチングに及ぼす初期pHの影響

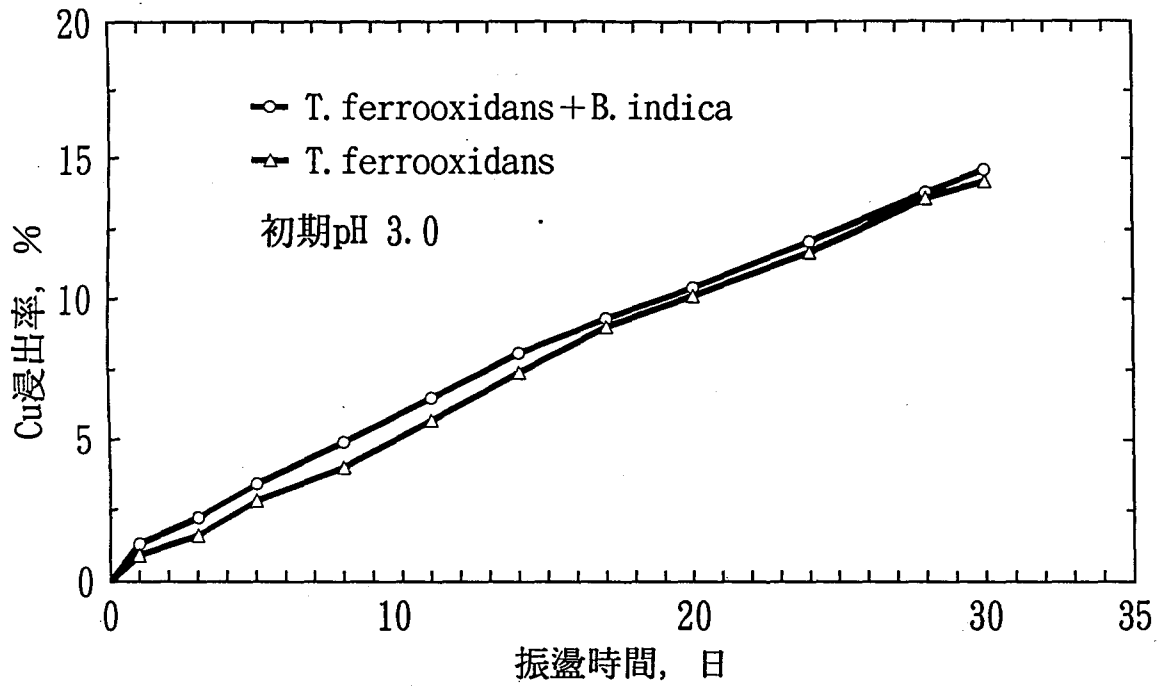


図2 黄銅鉱のバクテリアリーチングにおよぼす窒素固定菌 *Beijerinckia indica* の影響

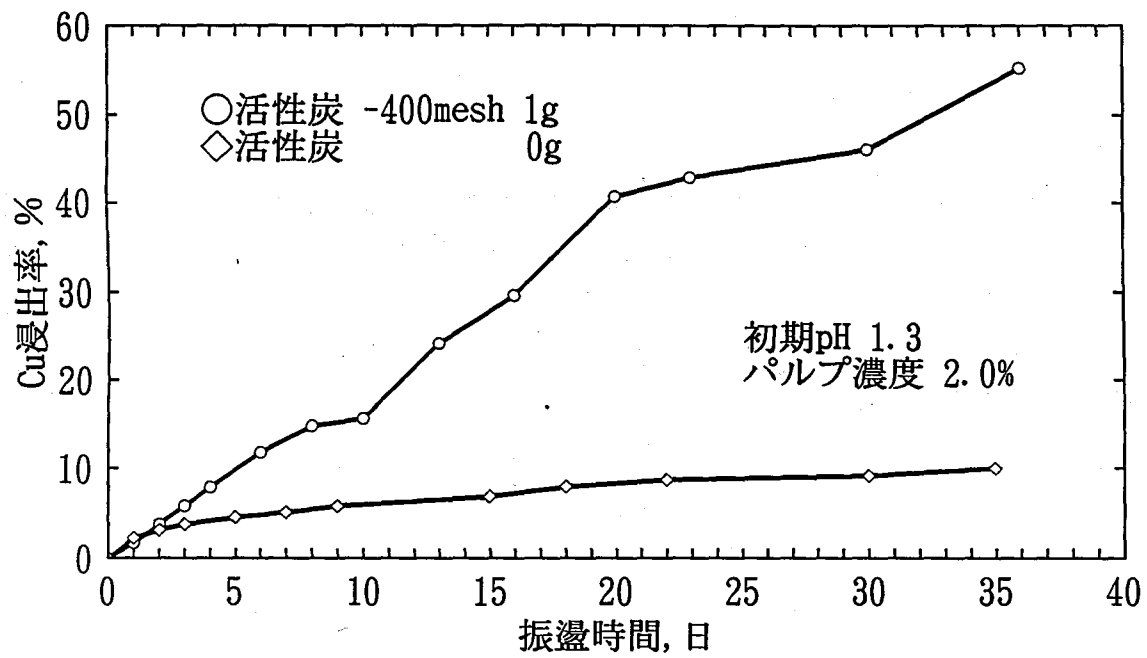


図3. 黄銅鉱のバイオリーチングにおよぼす活性炭添加量の影響

果を示したものである。いずれの粒度においても、実験初期段階では、溶出したFeイオンを $Fe^{2+}$ として存在するが、粒度が粗い活性炭を添加した場合ほど $Fe^{2+}$ の酸化が速く始まった。 $Fe^{2+}$ の酸化に伴い、酸化還元電位ならびにpHが著しく増加した。Cuの浸出に関しては、活性炭の粒度が細かいほど、高い浸出率が得られた。また、 $Fe^{2+}$ の酸化が始まると共に、Cuの浸出速度が速くなる傾向が認められた。Znの浸出については、最も粗い-200+280 meshの場合の浸出率は、他に比べ約7%ほど高いが、他の粒度の場合では差は認められなかった。

$Fe^{2+}$ の酸化と共に、Cuの浸出速度が著しく増加する傾向が認められたので、-400 meshの活性炭を1g添加し、初期 $Fe^{3+}$ 濃度を変化させて、バクテリアリーチング実験を行った。その結果を図6、図7に示した。 $Fe^{3+}$ を添加した場合、実験開始と共に $Fe^{3+}$ 濃度が減少した。酸化還元電位の変化は、 $Fe^{3+}$ 濃度の変化とよく対応しており、 $Fe^{3+}$ 濃度の低下と共に酸化還元電位が低下し、 $Fe^{3+}$ 濃度の増加と共に酸化還元電位が増加した。Cuの浸出については、11日目までは初期 $Fe^{3+}$ 濃度によるCuの浸出率の差は認められないが、 $Fe^{2+}$ の酸化が始まると、あらかじめ $Fe^{3+}$ を添加した場合の方が速い浸出速度を示した。図には、活性炭を加えた未接種の場合の結果も示しているが、接種した場合に比べ、Cuに浸出率は著しく低く、*T. ferrooxidans*が黄銅鉱の浸出に関与していることがわかる。Znの浸出については、実験初期において、初期 $Fe^{3+}$ 濃度が高いほど、高い浸出速度を示した。 $Fe^{3+}$ は閃亜鉛鉱を酸化溶解することより、 $Fe^{3+}$ を添加した場合は、 $Fe^{3+}$ が閃亜鉛鉱を酸化するため、実験開始と共に $Fe^{3+}$ 濃度が著しく減少するものと考えられる。

図8は、活性炭を添加し、初期pHを変化させて行ったバクテリアリーチングの結果である。Cuの浸出については、初期pHが2.0の場合が、最も浸出率が低く、初期pHが低下するとCuの浸出率が増加した。初期pHが1.5以下の場合には、32日目までは浸出率に差が認められない。しかし、 $Fe^{2+}$ の酸化が始まると共に、初期pHが1.0の場合には浸出速度が著しく増加し、最も高い浸出率が得られた。

活性炭を添加した場合、 $Fe^{2+}$ の酸化が始めると共にCuの浸出が著しく増加するが、 $Fe^{2+}$ の酸化が始まるまでの誘導期が長い。そこで、*T. ferrooxidans*の鉄酸化活性に及ぼす活性炭添加の影響について検討した。図9は、活性炭添加量を0、0.2および0.5gとした場合の $Fe^{2+}$ の酸化率の経時変化を示した。図には、 $Fe^{2+}$ を含む培地に活性炭を0.2gおよび0.5g添加し、1時間攪拌した後、ろ過し、そのろ液に*T. ferrooxidans*を接種して行った $Fe^{2+}$ の酸化実験の結果も示した。活性炭を添加した場合は、添加量が多いほど、 $Fe^{2+}$ の酸化に多くの時間を要した。また、 $Fe^{2+}$ の酸化が終了しても菌体濃度の増加は認められなかった。一方、ろ液を用いて行った実験では、活性炭無添加の場合と同じ速度で $Fe^{2+}$ に酸化が進行した。これらのことより、活性炭の添加による $Fe^{2+}$ が始まるまでの誘導期が長くなる原因の一つとして、活性炭への*T. ferrooxidans*の吸着が考えられる。

今回の実験では、活性炭によるCuの浸出促進の機構について検討を行わなかったが、今



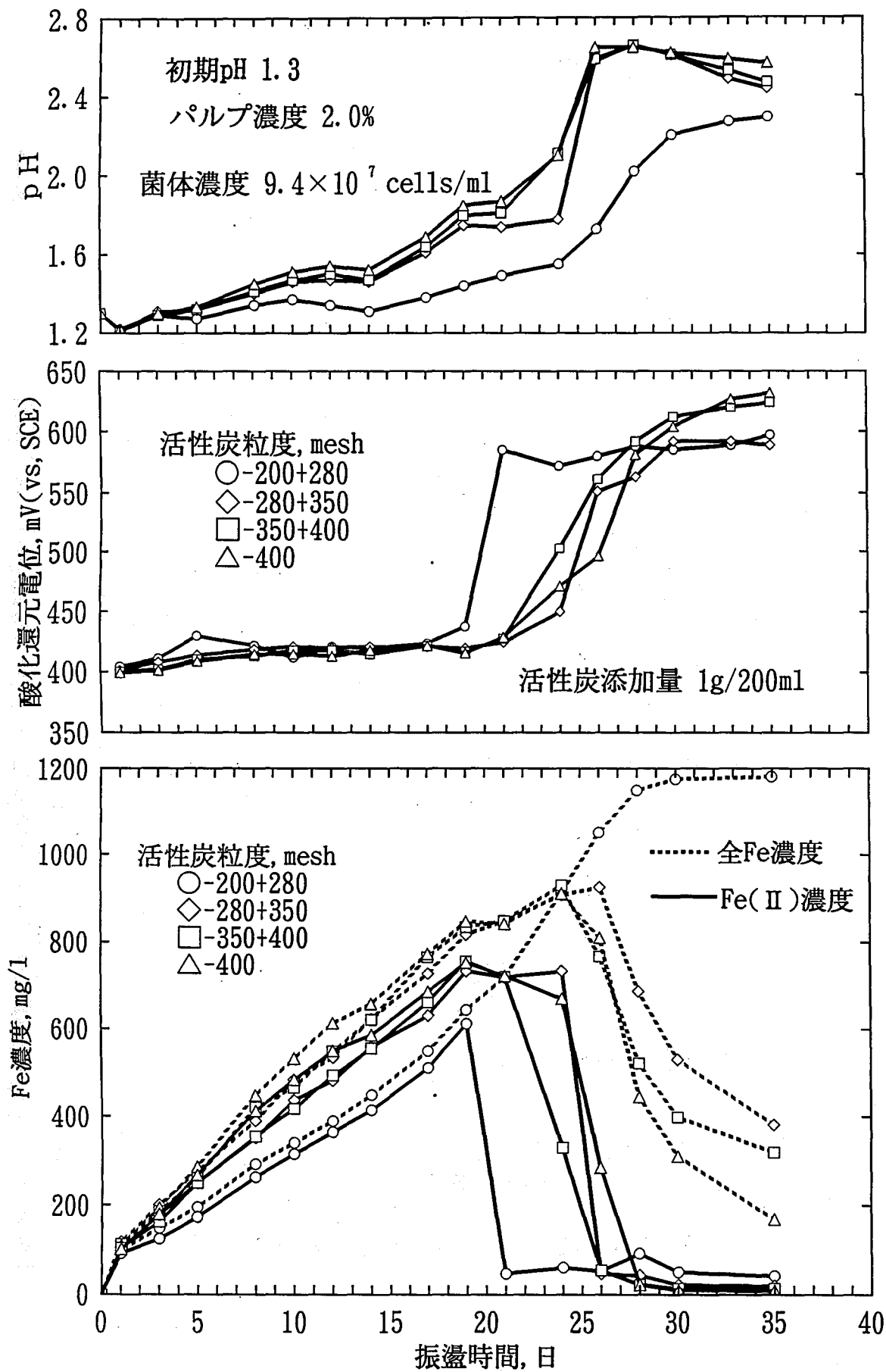


図4. 黄銅鉱のバイオリーチングにおよぼ活性炭粒度の影響

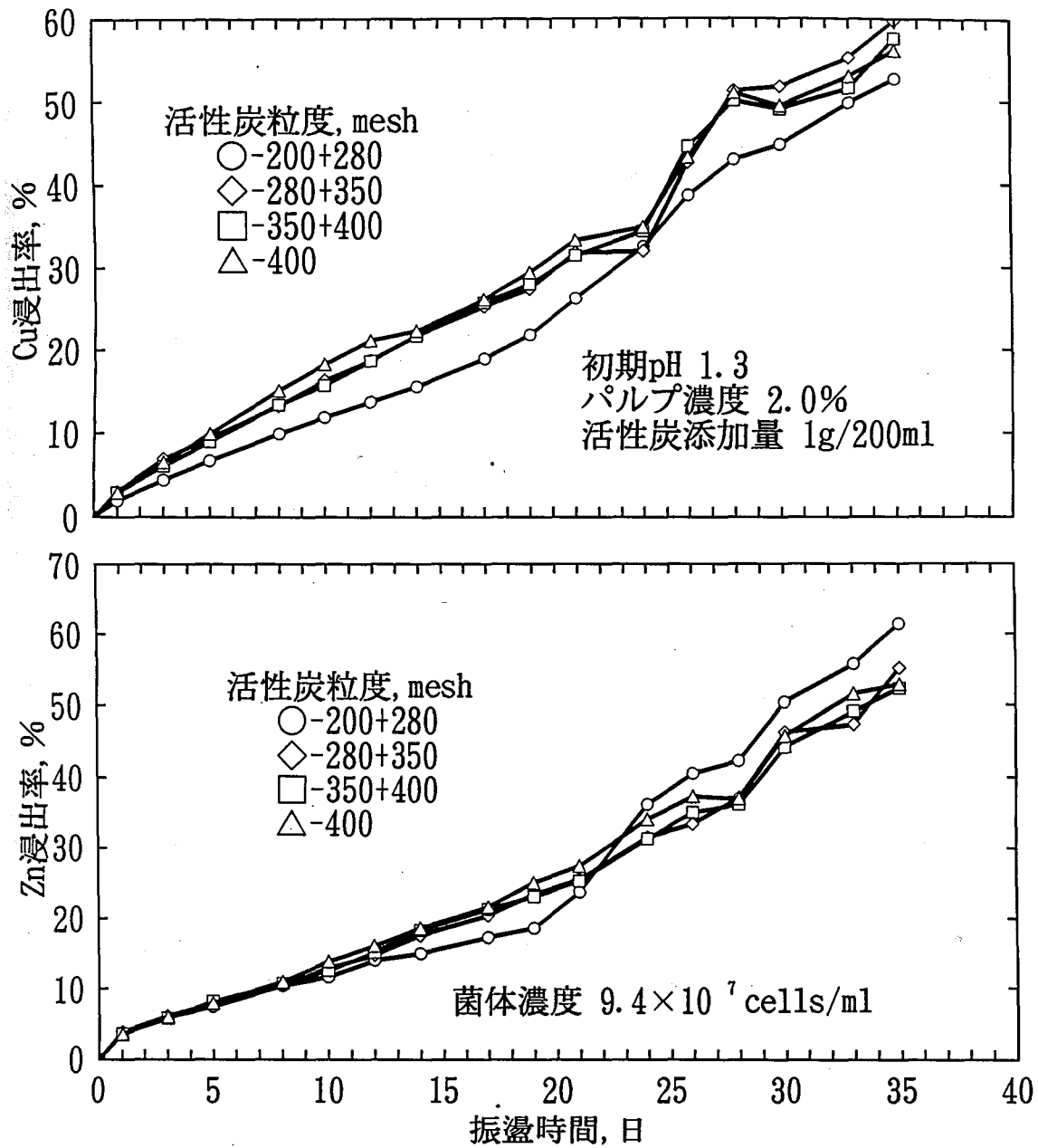


図5. 黄銅鉱のバイオリーチングにおよぼ活性炭粒度の影響

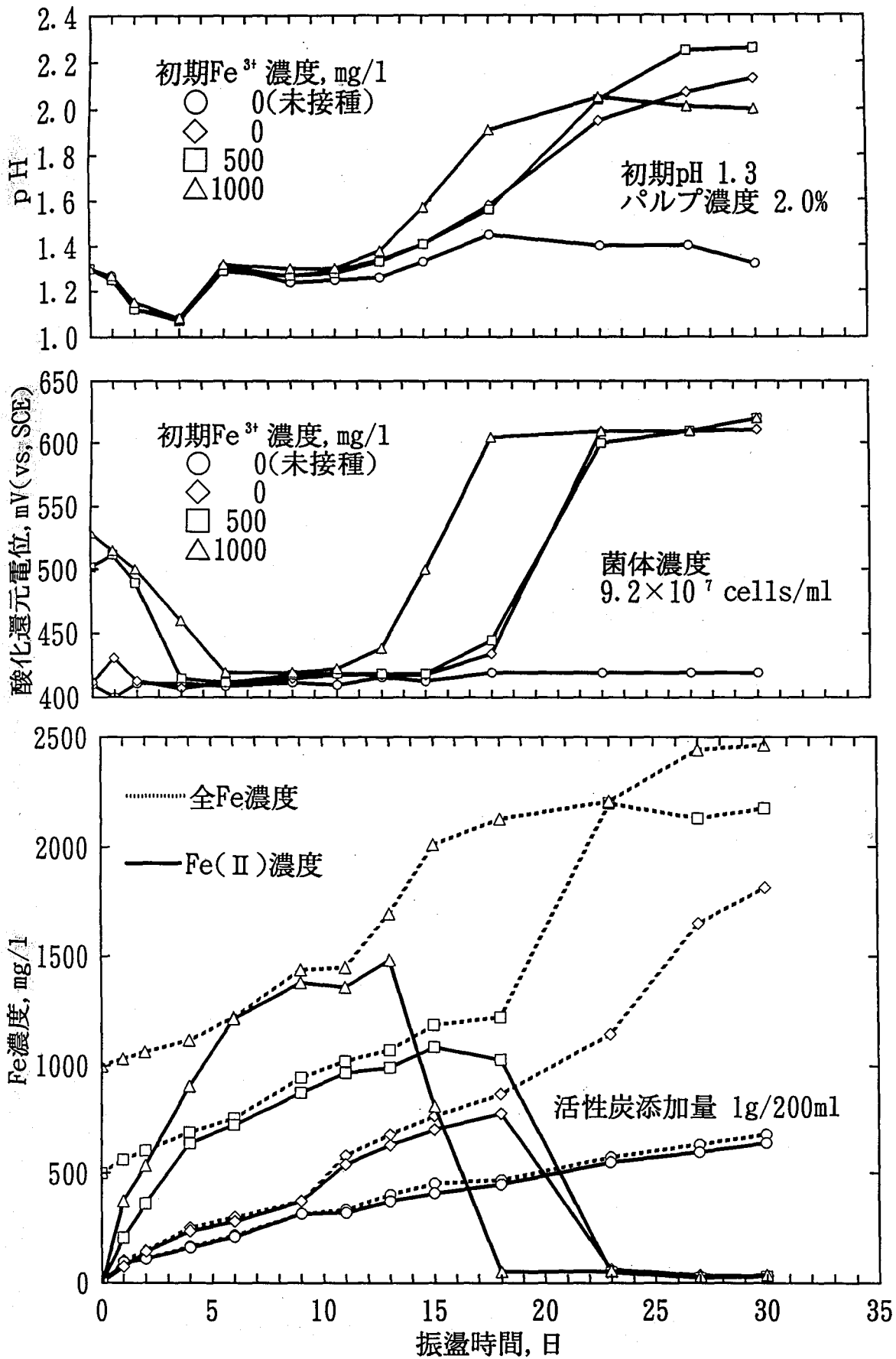


図6 活性炭による黄銅鉱の浸出促進に及ぼす初期Fe<sup>3+</sup>濃度の影響

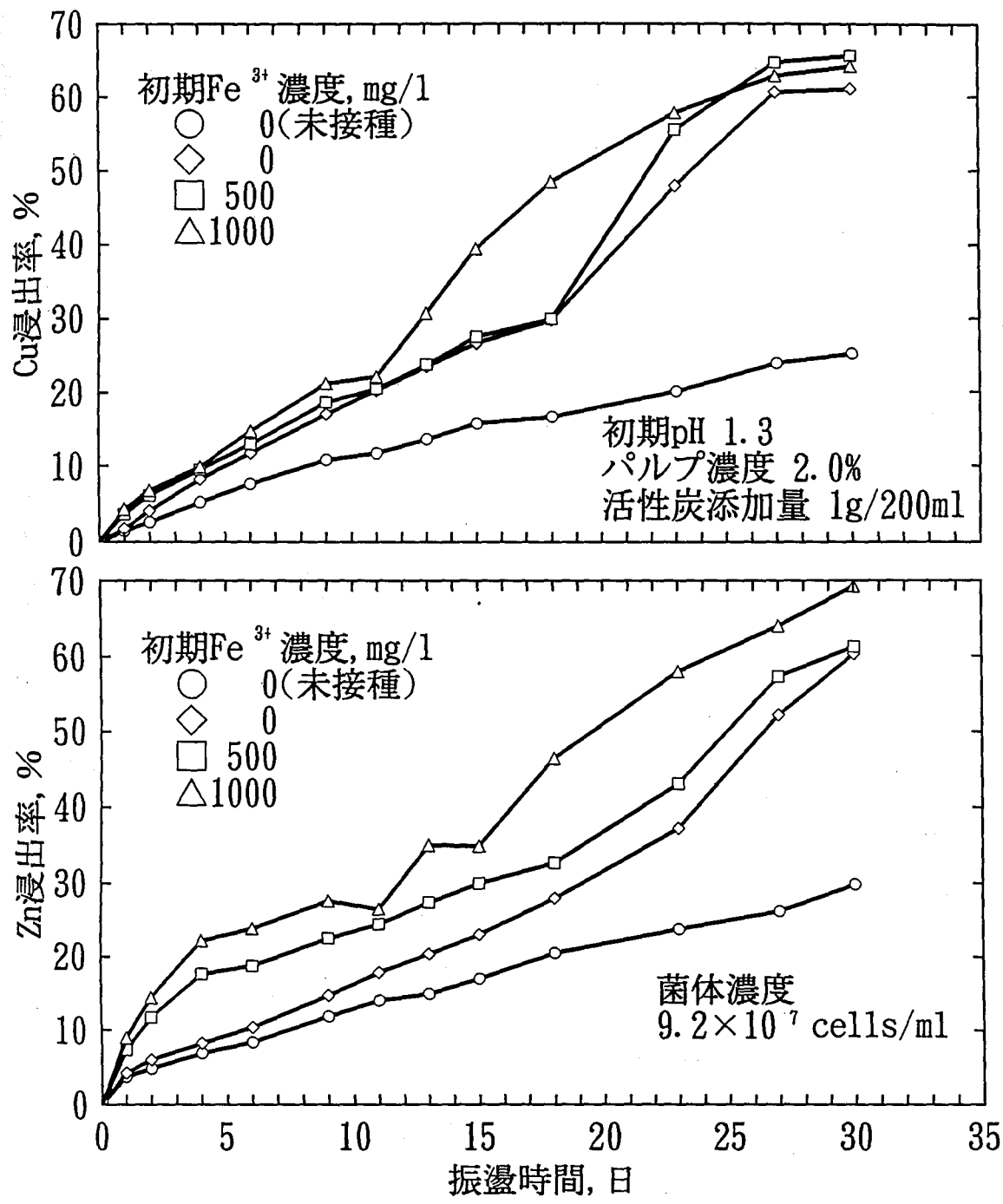


図7 活性炭による黄銅鋳の浸出促進に及ぼす初期 $Fe^{3+}$ 濃度の影響

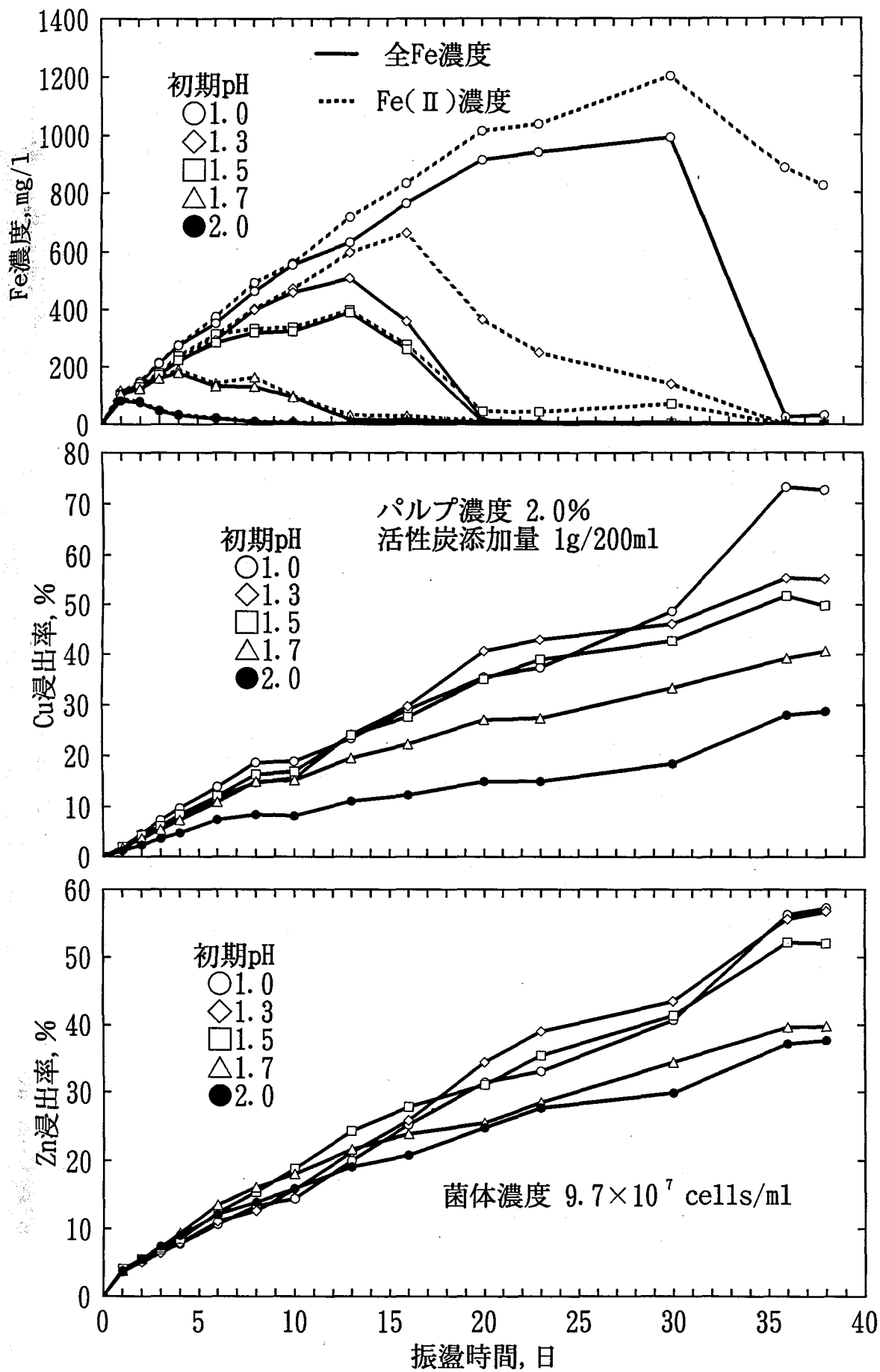


図8. 黄銅鉱のバイオリーチングにおよぼす初期pHの影響

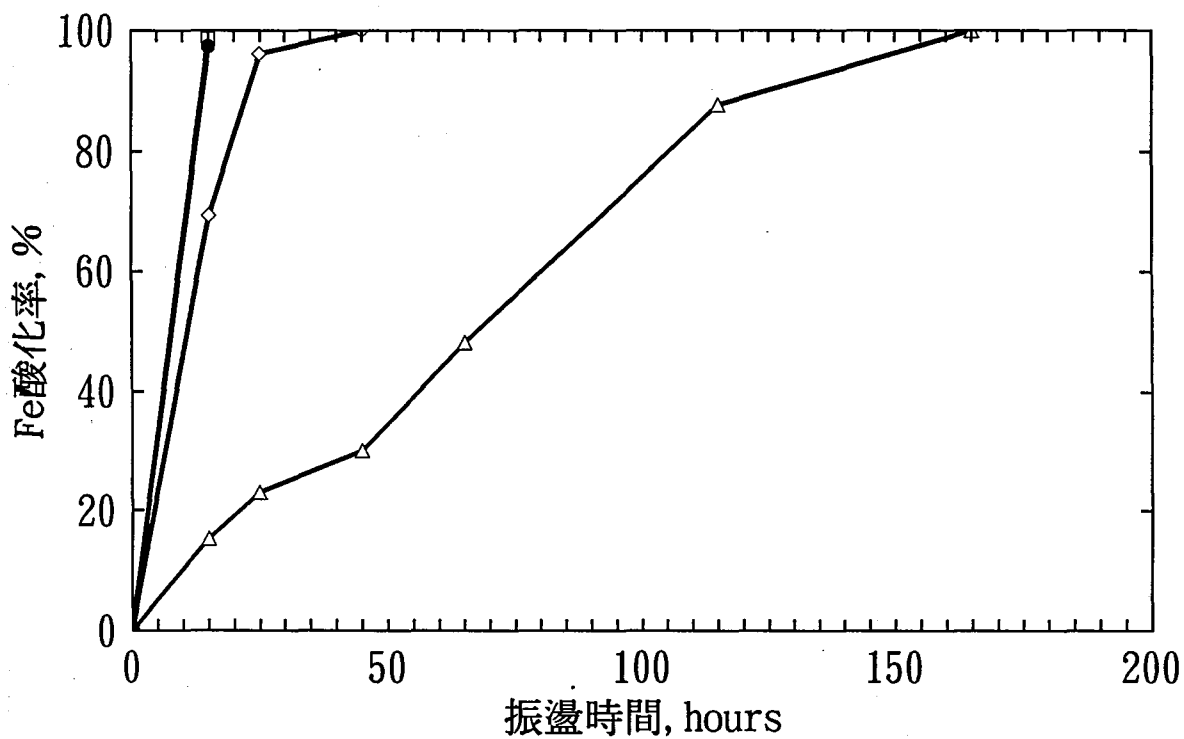
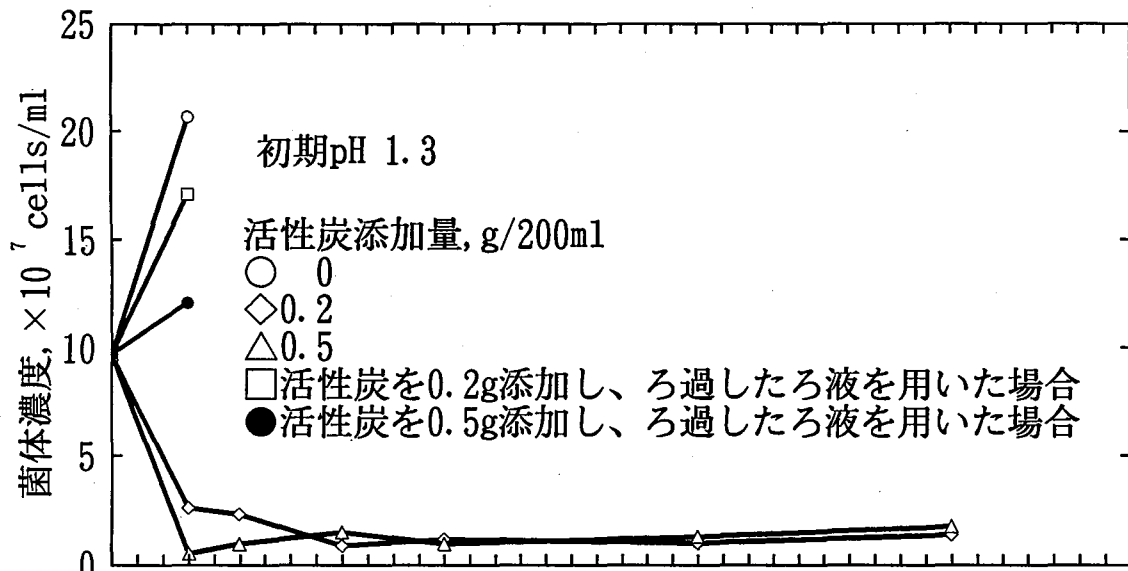
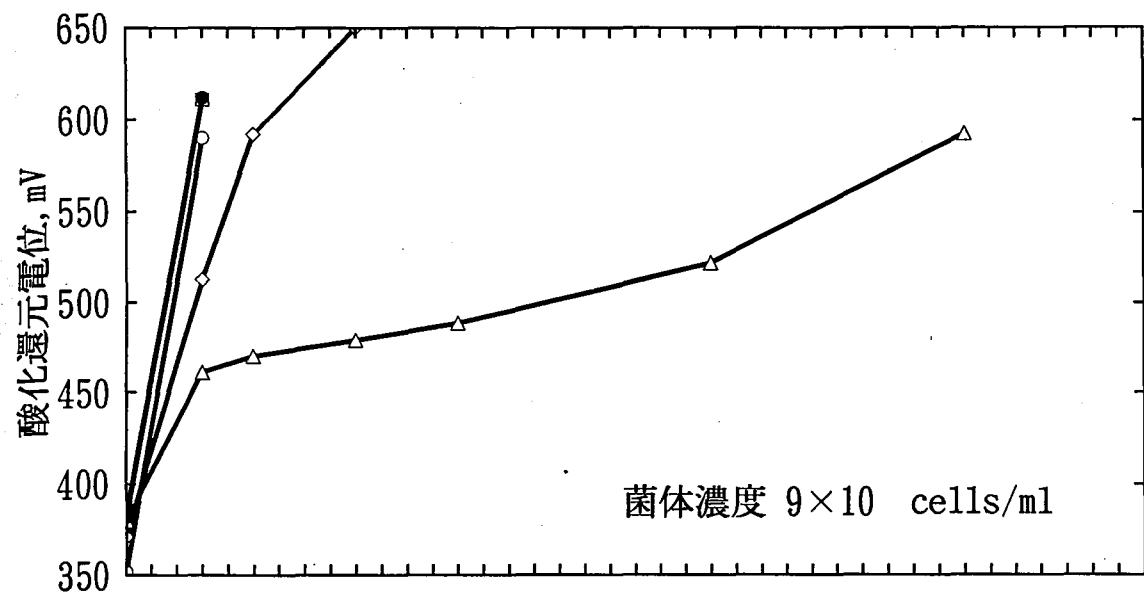


図9 T. ferrooxidansの鉄酸化活性に及ぼす活性炭の影響

後この点について研究を行う予定である。

#### 4. 結 論

黄銅鉱のバクテリアリーチングにおいてCuの浸出が停滞する理由として、*T. ferrooxidans*の増殖とともに蓄積する自らの代謝産物（排出物）により、*T. ferrooxidans*の増殖が阻害されることが考えられる。本研究は、この代謝物の除去法として、窒素固定菌により消化・分解する方法と活性炭で吸着除去する方法にとりあげて検討を行った。得られた結果をまとめると以下の通りである。

1. *T. ferrooxidans*によるバクテリアリーチングはpH3.0以下で行われており、まず窒素固定菌*Beijerinckia indica*(ATCC9540)を用いて、その生育におよぼすpHの影響について検討を行った。pH3.0では、窒素固定菌は増殖したが、pH2.5では僅かしか増殖せず pH2.0においては全く増殖しなかった。そのため、初期pHを3.0にして1ヶ月培養した後、pHを0.1づつ下げた培地に*Beijerinckia indica*を植え継ぐ操作を繰り返すことにより酸性に対する耐性を強めることを試みたが、その効果は認められなかった。初期pH3.0で行った*T. ferrooxidans*と*Beijerinckia indica*の混合菌でバクテリアリーチングを行ったが、*Beijerinckia indica*の共生の効果は認められなかった。

2. 活性炭を添加した場合は、銅の溶出が著しく促進された。たとえば、活性炭を添加しない場合、バクテリアリーチング35日後のCu浸出率は10%だか、活性炭を1g添加した場合は55%であった。（なお、黄銅鉱添加量は4g/200ml培地である。）。また、活性炭が微粒の場合ほど高いCu浸出率が得られた。

#### 5. 引用文献

- 1)山口宗男：昭和61年度日本鉱業会秋季大会分科研究会資料，H2，（1986）
- 2)Silverman, W. P. and Lundgren, D. G. : J. Bacteriol., Vol. 77, p. 642-647, (1959)