

人工バリア材料に対する
微生物の影響評価研究(Ⅱ)

(動力炉・核燃料開発事業団 研究内容報告書)

1995年3月

石川島播磨重工業株式会社

この資料は、動燃事業団の開発業務を進めるため、限られた関係者だけに配布するものです。従って、その取扱には十分注意を払って下さい。なお、この資料の供覧、複製、転載、引用には事業団の承認が必要です。また今回の配布目的以外のことには使用しないよう注意して下さい。

This document is not intended for publication. No public reference nor disclosure to the third party should be made without prior written consent of Power Reactor and Nuclear Fuel Development Corporation.

本資料についての問合せは下記に願います。

〒107 東京都港区赤坂1-9-13

動力炉・核燃料開発事業団

技術協力部 技術管理室

人工バリア材料に対する微生物の影響評価研究（Ⅱ）

石川島播磨重工業株式会社

要 旨

放射性廃棄物の処分に際し、微生物の人工バリアへの影響を評価することを目的に研究を行った。TRU廃棄物の処分を想定したアルカリ環境での硫酸塩還元細菌（SRB）のpH耐性試験を行い、pH11がSRBの生育限界であることを確認した。また、銅のオーバーパックを用いた場合に考えられる銅イオンのSRBに対する増殖阻害効果確認の予察試験及び文献調査を実施し、阻害濃度のまとめを行った。さらに、乾燥状態の圧密ベントナイト中への微生物の移行について、実験方法や測定方法の検討と予察試験を行い、試験手法における今後の取組課題を摘出した。また、TRU処分にあって考慮すべき微生物として脱窒細菌を挙げ、その培養方法等を文献調査し、耐性領域図作成試験への適用を検討すると共に、鉄酸化細菌、鉄還元細菌についても同様の調査、検討を行った。

本報告書は、石川島播磨重工業株式会社が動力炉・核燃料開発事業団の委託により実施した研究の成果である。

契約番号：060D0219

事業団担当部課室および担当者：東海事業所 環境技術部 地層処分開発室

（間野 正）

Study on Microbial Effects on Engineering Barrier
for Geological Disposal of Radioactive Wastes(II)

Ishikawajima-Harima
Heavy Industries Co.,Ltd.

A b s t r a c t

Biological tolerance of Sulfate-Reducing Bacteria(SRB) under alkaline condition, assuming geological disposal environment of TRU wastes, was studied. The upper limit of growth range of SRB was pH11. Considering copper-made container, inhibition effects of copper ions on SRB activity was investigated through preliminary test and literature survey, then inhibition concentration of copper ions was considered. Also a preliminary test was performed to observe migration behavior of bacteria through compacted bentonite. Considering the TRU wastes disposal, methods of incubation and its active range measurement for denitrifying bacteria were surveyed with those of Iron-Oxidizing Bacteria and Iron-Reducing Bacteria.

Work performed by Ishikawajima-Harima Heavy Industries Co.,Ltd. under contract with Power Reactor and Nuclear Fuel Development Corporation.

Contract No. : 060D0219

PNC Liaison : Geological Isolation Technology Section,

Tokai Works

(Tadashi Mano)

目次

1. まえがき	1
2. 試験方法	
2.1 SRBの高pH領域(10~13)のpH耐性領域図作成試験	2
2.2 銅イオンのSRB阻害効果の予察的試験	4
2.3 脱窒細菌及び鉄還元細菌、鉄酸化細菌の耐性領域図作成試験の調査・検討	4
2.4 圧密ベントナイト中の微生物移行の実験方法・予察試験	4
3. 結果と考察	
3.1 SRBの高pH領域(10-13)のpH耐性領域測定試験	9
3.2 銅イオンのSRB増殖阻害効果に関する予察試験	14
3.3 脱窒細菌及び鉄還元細菌、鉄酸化細菌の耐性領域図作成試験の調査・検討	17
3.3.1 概要	17
3.3.2 脱窒細菌	17
3.3.3 鉄還元細菌	30
3.3.4 鉄酸化細菌	37
3.3.5 耐性領域図作成への見通し	41
3.4 圧密ベントナイト中への微生物の移行に関する実験方法・予察試験	43
3.4.1 実験・測定方式の検討	43
3.4.2 圧密ベントナイト中の微生物の移行の予察試験	45
参考文献	49

目 次

図2.4-1	圧密ベントナイトの微生物透過試験装置の概略図	7
図2.4-2	ベントナイト検体の切り出しの概説図	8
図3.1-1	SRBの高pH耐性試験装置の概略図	10
図3.1-2	SRBの高pH側(10~13)における耐性領域図	13
図3.2-1	銅イオンの濃度におけるSRB菌の増殖遅延・阻害効果(濁度測定法)	15
図3.3-1	脱窒細菌の代謝モデル ⁵⁾	22
図3.3-2	脱窒細菌による安息香酸塩の分解経路 ⁹⁾	24
図3.3-3	脱窒細菌によるフェノールの分解経路 ⁹⁾	24
図3.3-4	pHが脱窒速度に及ぼす影響 ¹⁴⁾	25
図3.3-5	酸素が脱窒の中間産物蓄積に及ぼす影響 ¹⁷⁾	26
図3.3-6	気体の注入と採取が可能な試験管	27
図3.3-7	¹⁵ Nによる脱窒活性測定に用いられた容器の例 ²¹⁾	28
図3.3-8	アセチレン阻害法を用いたときの生成ガスの組成 ²³⁾	28
図3.3-9	アセチレン阻害法に用いられた実験装置の例 ²⁶⁾	29
図3.3-10	脱窒活性測定のためのガスクロマトグラフによるN ₂ O分析例 ²⁷⁾	29
図3.3-11	自然界の有機物分解における鉄還元細菌の役割 ²⁹⁾	32
図3.3-12	酢酸消費、細胞増加と鉄還元の関係	34
図3.3-13	純粹培養株での酢酸消費、細胞増加と鉄還元の関係	34
図3.3-14	3,4-ヒドロキシ安息香酸集積培養での鉄還元	34
図3.3-15	温度が鉄還元に及ぼす影響	35
図3.3-16	温度が鉄還元に及ぼす影響	35
図3.3-17	酸素濃度が鉄還元に及ぼす影響	35
図3.3-18	NO ₃ ⁻ が鉄還元に及ぼす影響	35
図3.3-19	pHが鉄酸化に及ぼす影響(Thiobacillus ferrooxidans)	39
図3.3-20	鉄酸化細菌接種のときのFe(II)減少とFe(III)増加の測定例	40

表 目 次

表2.1-1	m-ISA改良培地	3
表2.4-1	菌の大きさ	6
表3.1-1	S R Bの高pH領域(10-13)のpH耐性領域測定結果	13
表3.2-1	銅イオンのS R B増殖阻害試験結果	14
表3.2-2	S R B菌群の銅イオンによる最小阻害濃度(増殖阻害を示す最小濃度)	16
表3.2-3	他の菌類の銅イオンの阻害濃度比較(最小阻害濃度)	16
表3.3-1	報告されている脱窒細菌の種類と特徴 ⁵⁾	22
表3.3-2	グループ分けした単離株の基質利用性 ⁶⁾	23
表3.3-3	Hyphomicrobiumによるメタノールの利用 ⁷⁾	24
表3.3-4	栄養塩を添加したアスファルトからのガス発生 ¹⁰⁾	25
表3.3-5	温度が脱窒速度に及ぼす影響 ¹⁸⁾	26
表3.3-6	脱窒細菌の培地の例(硝酸塩肉エキス培地) ¹⁹⁾	27
表3.3-7	脱窒細菌用培地用例(Gilteyの培地) ¹⁹⁾	27
表3.3-8	脱窒細菌の培地の例(Hyphomicrobium用培地) ¹⁴⁾	27
表3.3-9	脱窒細菌の培地の例(Paracoccus用培地) ¹⁷⁾	27
表3.3-10	報告されている鉄還元細菌の種類と物質代謝 ²⁹⁾	32
表3.3-11	いろいろな基質を用いたときの鉄還元の比較	33
表3.3-12	鉄還元細菌用培地の例(Pseudomonas用培地) ³⁷⁾	36
表3.3-13	鉄還元細菌用培地の例(Alteromonas用培地) ³²⁾	36
表3.3-14	鉄還元細菌用培地の例(GS-15に使用) ³¹⁾	36
表3.3-15	鉄還元細菌用培地の例(Clostridium, Bacillus用培地) ³⁹⁾	36
表3.3-16	鉄酸化細菌として報告された微生物の種類と特徴	39
表3.3-17	鉄酸化細菌用培地の例(Sphaerotilus用) ⁵¹⁾	39
表3.3-18	鉄酸化細菌用培地の例(Galionella用) ⁴⁸⁾	39
表3.3-19	鉄酸化細菌用培地の例(Thiobacillus ferrooxidans用) ¹⁹⁾	40
表3.3-20	鉄酸化細菌用培地の例(Sulfolobus用) ⁴⁹⁾	40
表3.3-21	純粋培養微生物の耐性領域図作成方法の実施例と方案例	42
表3.4-1	圧密ベントナイト検体の各層における菌数測定結果例	45

写真目次

写真2.4-1	大腸菌（アンピシリン耐性菌）の顕微鏡写真	6
写真3.1-1	高pH領域SRB増殖測定試験における培地の色調変化例	11
写真3.1-2	高pH領域SRB増殖における培地の黒色変化例とSRB菌	12
写真3.2-1	試験中の特製光度計セル付き嫌気性培養試験管	14
写真3.2-2	銅イオンと培地成分の発色	14
写真3.4-1	培養液投与中の圧密ベントナイト試験検体の状況	44
写真3.4-2	薄切り切片の寒天培地上での直接培養方法の状況	44
写真3.4-3	圧密ベントナイト検体の各層における菌数	46
写真3.4-4	菌数測定サンプルにおける投与菌以外のカビの検知例 上層部	47
写真3.4-5	保存したベントナイト検体の微生物群の繁殖 1 - 2週間後	47

1. まえがき

TRU廃棄物は微生物の栄養源となる有機物を豊富に含有するため、処分システムの性能を評価する上で、微生物活動の影響を把握する必要がある。TRU廃棄物の人工バリアの一つとしてコンクリート（高レベル廃棄物の場合はベントナイト緩衝材）が考えられており、その存在によって処分環境が高pH領域（10～13）になると予想される。硫酸塩還元細菌（SRB）は、地層処分場のような地下で想定される嫌気的な環境で増殖し活動することができ、また増殖して活動すれば腐食などに影響することから、処分における微生物の活動を評価する際の重要な細菌である。このSRBの高pH環境での耐性を調べるため、本年度は高アルカリ領域に耐性のあるSRBを選定し、還元性雰囲気条件（低Eh）を設定（温度は一定）して増殖の有無を確認し、pHに対する耐性試験を実施した。

高レベル放射性廃棄物のオーバーパック材料として銅の検討も行われている。本研究では、銅イオン共存下でのSRBの生息を調べる試験を予察的に行い、文献調査による情報も合わせてSRBの増殖に対する銅イオンの阻害濃度のまとめを行った。

また、TRUの処分環境を考慮して今後評価を行っていく必要のある細菌として脱窒細菌を挙げ、これらの細菌の耐性領域図作成試験への見通しを立てるため、その培養手法、増殖検出手法等について文献による調査、検討を行うと共に、鉄還元細菌、鉄酸化細菌についても人工バリアへの影響を鑑み、同様の調査を行った。

さらに、本年度初めての試みであるが、人工バリアである圧密ベントナイト中の微生物の移行実験方法を検討し、選定した微生物を用いて実験によりその方法の妥当性を確認する予察試験の実施、及び得られたデータについて検討評価を行った。

本年度の研究項目をまとめると、以下の通りである。

- ・SRBの高pH領域（10～13）のpH耐性領域図作成試験
- ・銅イオンのSRB阻害効果の予察的試験
- ・脱窒細菌及び鉄還元細菌、鉄酸化細菌の耐性領域図作成試験の調査・検討
- ・圧密ベントナイト中の微生物移行の実験方法・予察試験

2. 試験方法

2.1 SRBの高pH領域(10~13)のpH耐性領域図作成試験

人工バリア材など放射性廃棄物処分場の環境は高pH領域(10~13)になると予想される。そこでアルカリ領域に耐性のある硫酸塩還元細菌(SRB)を選定し、高pH領域(10~13)におけるSRBの耐性領域のデータを追加取得する。培養温度35℃で嫌気性雰囲気条件(低い酸化還元電位、Eh)を設定できる装置の改良を行い、増殖の有無を確認し、以下に示すようにSRBの試験を行い、高pH領域における耐性領域図を作成する。

試験に供する好アルカリ性SRB菌の菌種のスクリーニングをIHI保持菌または再度ベントナイト入り土壌より菌を探索するなど適種を選定する。

選定にあたっては、高アルカリ側の増殖であり、まず培養中のm-ISA培地(表2.1-1)の成分の沈降、pHの維持、還元剤などの改良も必要となり、これらの検討を行いつつ菌の増殖の確認をする。なお低いEhを維持するために還元剤(主としてシステイン、チオグリコール酸ナトリウムと窒素、エアーにて調節を行った(後述 図3.1-1参照)。選定したSRB菌(IHI 75-12菌)を嫌気性ファーマンター中で以下の手順にて培養を行った。

- (1) 500mlの嫌気性ファーマンターで前記のように検討した各アルカリpHの条件で培地と菌液(7ml)を嫌気的に接種する。
- (2) 温度35℃の恒温槽にて還元剤、窒素、エアーを適時通気しながらpHをコントロールして増殖を促し、生育を判定する。この際の、嫌気度を制御することがポイントになる。
- (3) これで増殖が確認された場合は、さらに還元性環境を緩めた(高Eh)側で条件を設定して新たに試験を行う。
- (4) 増殖の確認ができない場合はもっと強い還元剤の添加などの操作により可能な限り低Ehの条件にして増殖の有無を測定することとする。
- (5) 増殖の判定

菌の増殖に伴う硫化水素の発生によるFeSの生成と菌体との混合濁度の増加及び目視による黒色変化で増殖の判定を行う。さらには顕微鏡観察により菌の増殖を確認する。

表2.1-1 m-ISA改良培地

I 液	乳酸Na	3.5g
	トリプトン*1	5.0g
	NH ₄ Cl	0.2g
	クエン酸(Ⅲ)鉄アモニウム	0.1g
	Na ₂ SO ₃	0.5g
	Na ₂ SO ₄	0.5g
	FeSO ₄ ・7H ₂ O*2	0.2g
	MgSO ₄ ・7H ₂ O	2.0g
	蒸留水	980ml
II 液	K ₂ HPO ₄	0.5g
	蒸留水	10ml
*3 III 液	システイン塩酸	0.5g
	チオグリコール酸Na	0.1g
	蒸留水	10ml
pH		10~13

*1：沈澱生成の影響を考慮して添加量の検討要

*2：硫化物生成(FeS)時のコントロールのため添加量の検討

*3：還元剤。Eh保持のためシステイン-HCl、チオグリコール酸
添加を検討

2.2 銅イオンのSRB阻害効果の予察的試験

微生物の活動を制御するために銅イオンの共存下でSRB菌の生育を予察的に調べる。

予備テストの後にガスヘッドを窒素で置換した特製光度計セル付き嫌気性培養試験管を使って以下の条件で各銅イオン濃度における菌増殖阻害濃度を検証した。

試験条件

SRB菌： *Desulf. desulfuricans* (ATCC 7757)。

培地： m-ISA培地、pH 7.2。培養温度：35℃。

添加銅イオン濃度 (ppm)： 250, 125, 63, 51, 25.4, 12.7, 0。

菌の増殖は培養後経時的に増殖に伴う菌体と黒変の濁度(波長660nm)を測定する方法と目視により検知した。また銅イオンの阻害効果は接種菌量を変えて3回行った。

2.3 脱窒細菌及び鉄還元細菌、鉄酸化細菌の耐性領域図作成試験の調査・検討

脱窒細菌及び鉄還元細菌、鉄酸化細菌の培養手法、増殖検出手法等について以下のような観点から調査を行う。

(1) 種類の調査

これらの微生物の種類として報告されているものを調査する。

(2) pHに対する生育範囲の調査

これらの微生物の生息できる最大pH範囲を調査する。

(3) 培地など培養方法の調査

これらの微生物の培地など培養方法として報告されているものを調査する。

(4) 増殖・活性検出法の調査

これらの微生物の増殖量または活性を検出する方法を調査検討する。

以上の調査、検討をもとに各々の微生物の耐性領域図作成への見通しをつける。

2.4 圧密ベントナイト中の微生物移行の実験方法・予察試験

圧密ベントナイト中の微生物の透過の検討にはまずベントナイト中の微生物群による測定の流れを妨ぐ必要がある。そこで、材料、器具類の滅菌および操作処理上の雑菌の混入に対して考慮しながら測定法の検討と予察試験を試みた。

(1) ベントナイト成型試験体

ベントナイトはクニゲルV Iを用いて、粉を浸透させながら紫外線を照射してさらに2度、70℃、1時間の加熱による殺菌を行った。この材料を成型機にて圧力230 kg/cm²にて圧密1.8 g/cm³、径50 mmφ x 25 mmHのベントナイト円筒型成型体を作成した。

(2) 供試菌

細菌の中で比較的小型であり、試験期間が長期にわたる事が予想される事より、ベントナイト中の嫌氣的条件でもまた滴下時の好氣的条件でも菌の増殖が可能な事を考慮して大腸菌を選定した(表2.4-1、写真2.4-1)。大腸菌培養は色素(エオシン)やpH指示薬(BTB)を含むEMBまたはLB培地(組成を以下に示す)、pH 7.2(日水製薬)を用いて35℃で培養を行って増殖期の菌液を用いた。なお菌の長く生存させる様な試験体への供与条件の検討も行った。

EMB培地	しょ糖：10g、コハク酸ナトリウム：5g、食塩：1g、硫酸マグネシウム：5g 1水素リン酸カルシウム：2g、硫酸アモニウム：5g、メチルソフター：0.05g、 エオシンイロー：0.4g
LB培地	肉エキス：3g、ペプトン：10g、乳糖：5g、BTB：0.024g

(3) 試験装置と菌の投与方法

図2.4-1に試験装置の概略図を示すように恒温室内で上、下蓋付の亚克力製の格納容器にベントナイト成型体と焼成アルミナフィルタ(孔径5~100ミクロン)を無菌的に設置した。この際上面にOリングと振じ込み蓋で液漏れのないように境界を密着させた。培養菌液を上部よりメッシュ付きチューブを通して滴下させ、液量を調整させて、菌及び培養液の透過の有無の予備試験を試みて測定法に対する検討を行った。また試験後の試験体の容器からの抜きだし方法と試験体中の菌の測定法についての検討も試みた。図2.4-2に示すように底面から検体は扇型に6片切り出す方法を用いた。なおこの投与菌の生息(生育)菌数は試験体を無菌的に切りだして上記寒天培地、一般生菌数計測用寒天培地によるコロニー計測法によるものと切り出したベントナイト切片を直接寒天培地で培養する方法も検討した。さらにはベントナイト検体の残り半分を滅菌室で乾燥をなるべく防いで保存して微生物群のその後の増加によるベントナイトの変化も観察した。

表2.4-1 菌の大きさ

菌名	大きさ
枯草菌	0.6~0.9×1.6~4.0 μ
大腸菌	0.5~1.0×2~4.0 μ
乳酸桿菌	0.6~0.9×1.5~6.0 μ
ブドウ状球菌	0.8~1.0 μ
コレラ菌	1.5~3.0×0.4~0.6

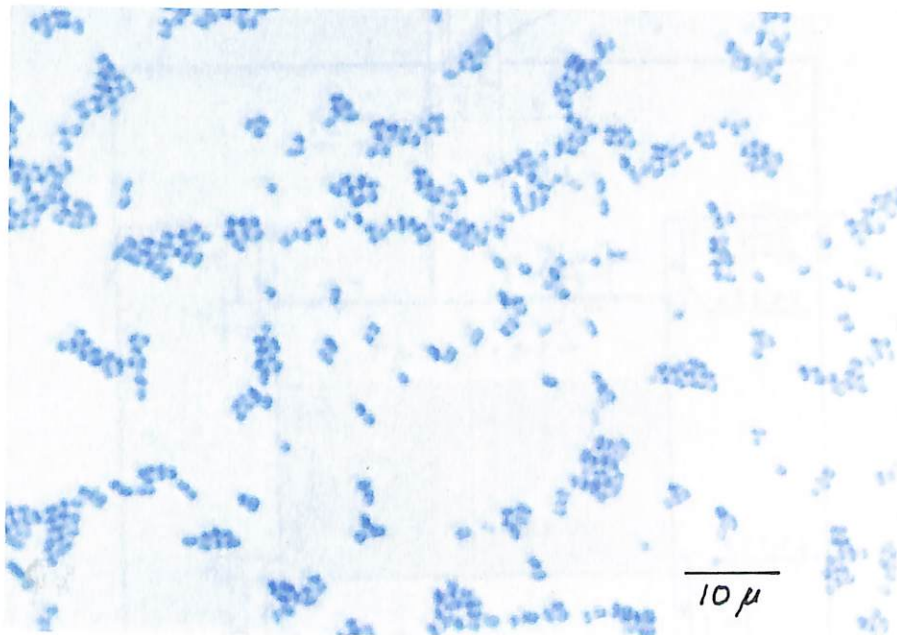


写真2.4-1 大腸菌（アンピシリン耐性菌）の顕微鏡写真

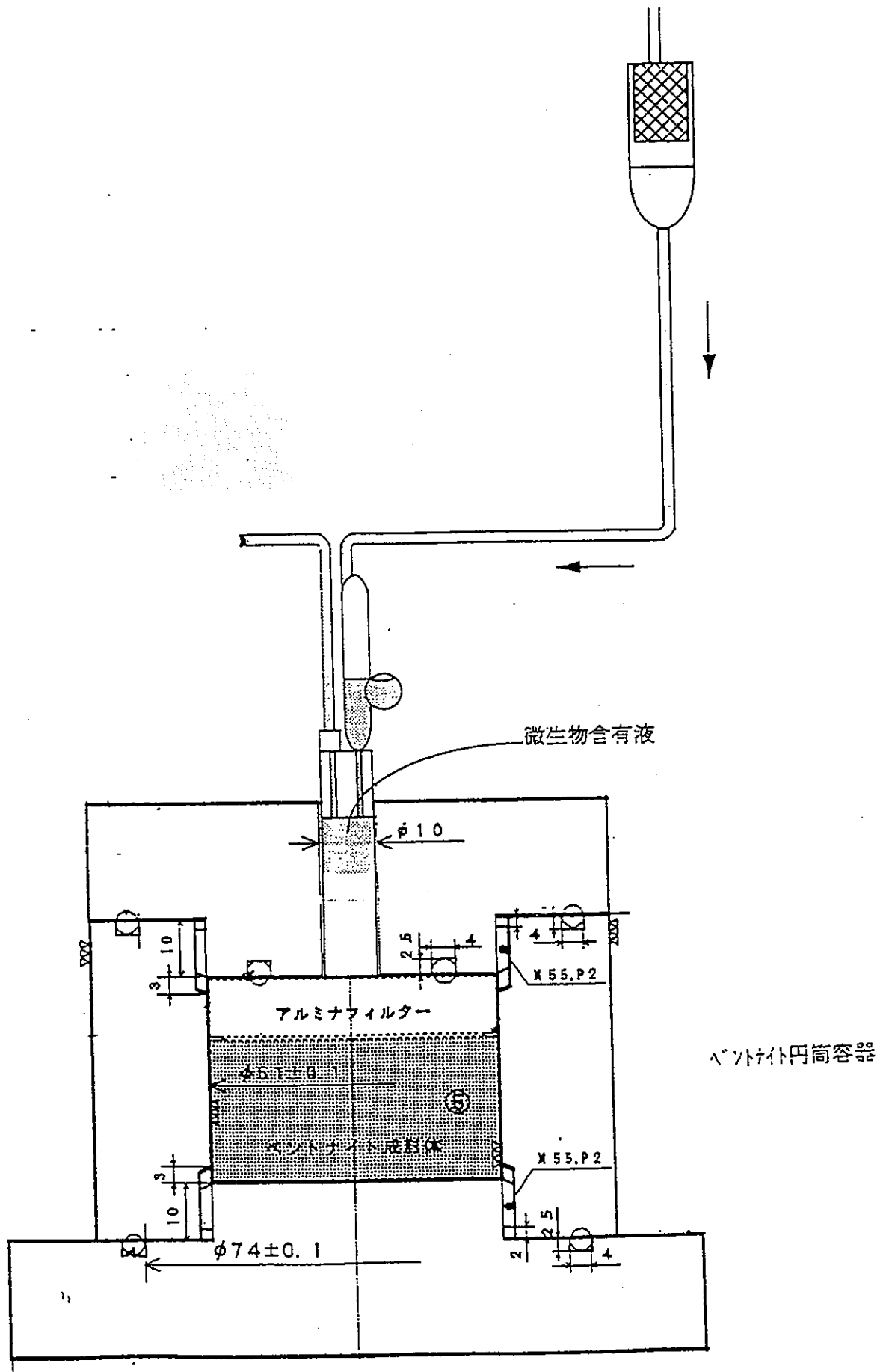


図2.4-1 圧密ベントナイトの微生物透過試験装置の概略図

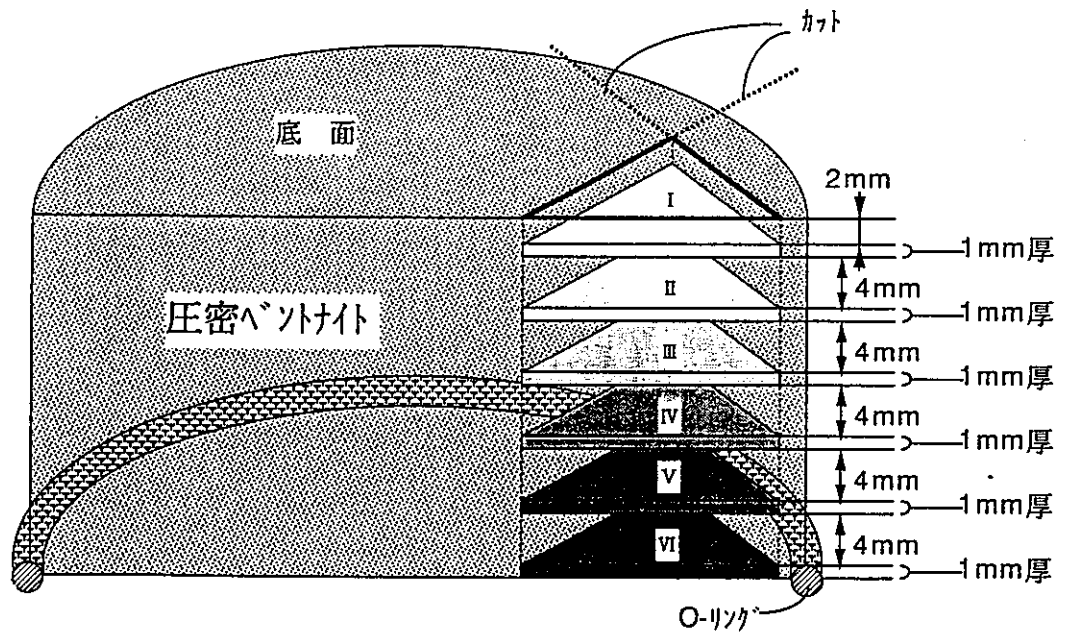


図2.4-2 ベントナイト検体の切り出しの概説図

3. 結果と考察

3.1 SRBの高pH領域(10-13)のpH耐性領域測定試験

ベントナイト、土壌からロールチューブ法で単離したアルカリ耐性IHI 75-12菌株をこの試験用に選定した。

この菌株の増殖の有無を各アルカリ側pHで培地の酸化還元電位(Eh)を嫌気側に設定して調べた。なお本試験に先立ち低Eh側の維持の為に検討を行った。即ち低いEhを制御する為に還元剤などの供給系統について、図3.1-1のような試験装置を改良して用いた。その他の条件設定も一般的に未知な部分が多くこれまでの実験中においても以下の工夫や留意を必要とした。

- ① Ehを一定に保つために還元剤、窒素ガスだけでは十分な設定が出来にくく、微量エア-の添加など細かな工夫を要する。一部リレー回路の増設、添加用還元剤とその保持法などに工夫をした。これによって低Eh側において±25mV程度の幅の制御が可能になった。
- ② 一定Eh条件で長期に培養した場合、培養液の色調の変化や沈殿物の増加が生じる。従ってこの場合、濁度の測定による増殖判定が難しくなる。また培養液が黒味がかかった灰色、茶色や緑青色になることが見られ、これらの現象の観察をする一方、対策として菌の接種をしないものを同時に対象にして試験の信頼性を高める実験も試みた。この色調の変化は茶褐色になる場合は主にpH10~11で見られ、これはこの条件下で還元剤の酸化によるものと思われ、これはEhの制御の精度にも係わる事が分かった(写真3.1-1a)。従ってこの色調の出方は培地の酸化度と還元剤の添加量即ち設定Ehにも依存し、一概に培養時間では決める事が困難であった。写真例には一応の目安を示した。また灰青色の沈着物は還元状態が続いた培地、特に液の滲み部で始めに検知され、5日間程度の経過で観察される(写真3.1-1b)。その為菌の増殖の判定はアルカリ側であるので硫化水素の発生量では無理であり、従って菌の増殖で明らかに黒変することと培養菌液の顕微鏡による観察を用いた(写真3.1-2)。

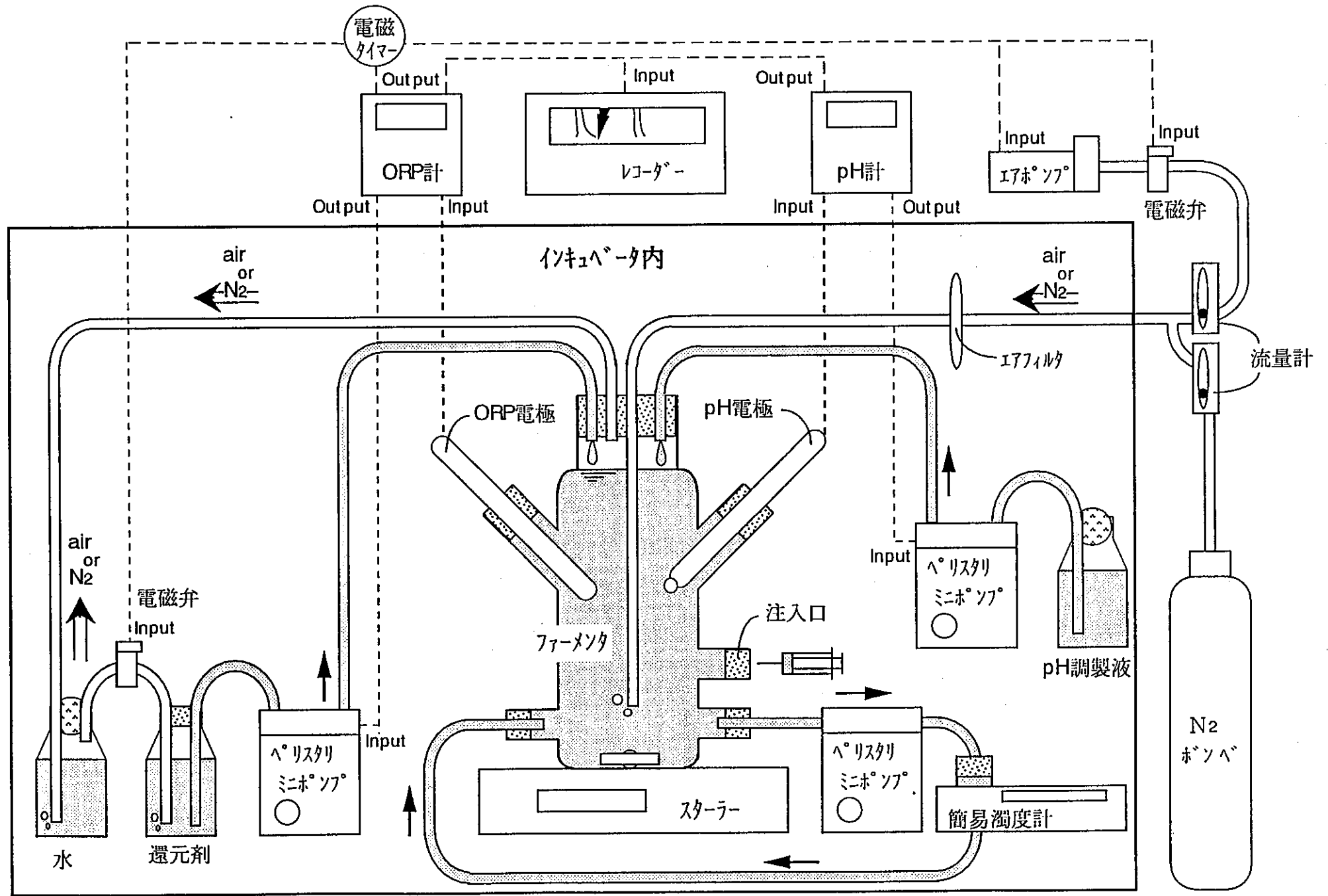


図3. 1-1 SRBの高pH耐性試験装置の概略図



a 非増殖菌培養液
茶褐色
培養3-4日目

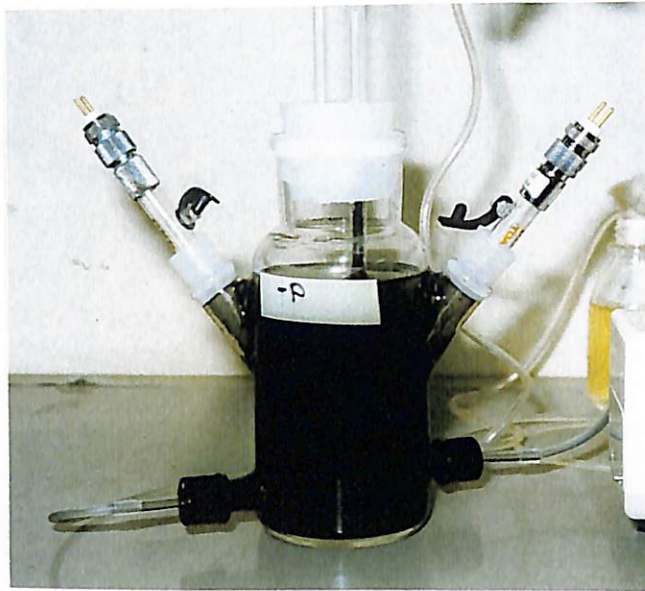


b 非増殖菌培養液
灰青色
培養5日目

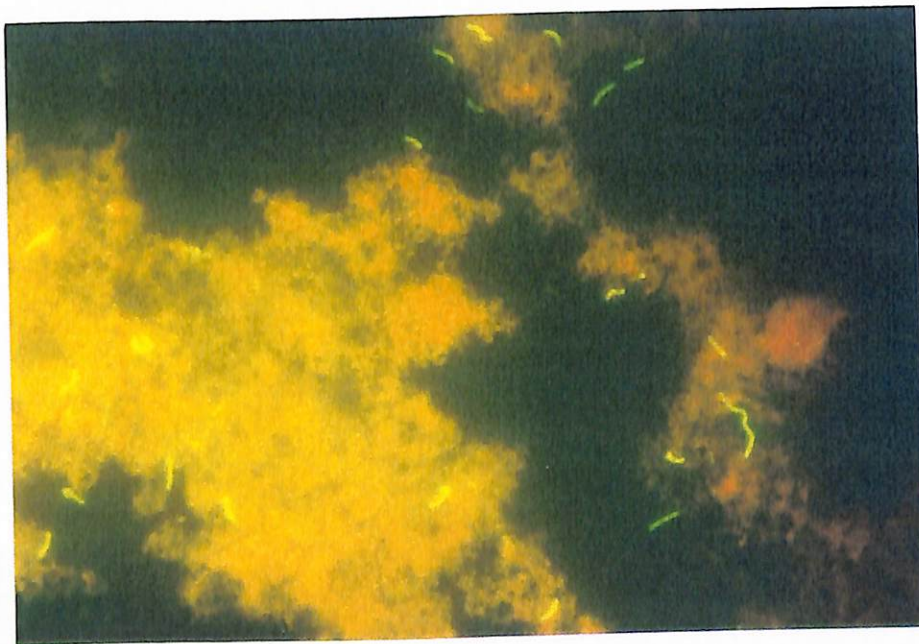


培養10日目

写真3.1-1 高pH領域SRB増殖測定試験における培地の色調変化例



増殖菌培養液
黒変 2日目



SRB菌

写真3. 1-2 高pH領域SRB増殖における培地の黒色変化例とSRB菌

これらの実験によるSRBの高pH領域(10-13)の増殖領域を表3.1-1と領域図を
 図3.1-2に示す。pH10では-270mv以下のEhで菌の増殖が植菌後2、3日で見ら
 れる。またpH11では、これより更に低い-360mv以下のEhで菌の増殖が辛うじ
 て見られる。ただし、このpHを長時間おいた場合は菌が死滅するようである。また、
 pH12、13では-360mvの低いEhでも全く増殖が認められない。

因みに別の中性増殖菌SRB(ATCC7757)ではpH10以上では増殖が難しい。

表3.1-1 SRBの高pH領域(10-13)のpH耐性領域測定結果

	Eh (mv)	増殖判定
pH 10	-330	++
	-270	++
	-215	-
	-150	-
pH 11	-360	++
	-270	-
	-235	-
	0	-
pH 12	-360	-
	-270	-
pH 13	-360	-
	-270	-

++ : 十分増殖 + : 増殖 ± : 僅かな増殖 - : 増殖無し

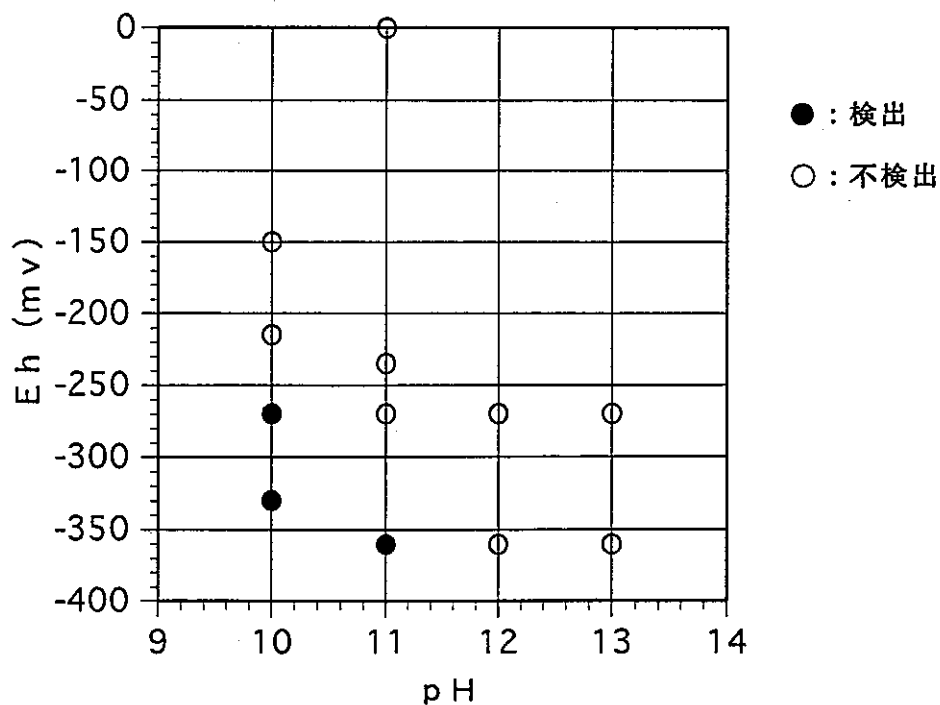


図3.1-2 SRBの高pH側(10~13)における耐性領域図

3.2 銅イオンのSRB増殖阻害効果に関する予察試験

予備テストの後に特製光度計セル付き嫌気性培養試験管を使って以下の条件で各銅イオン濃度におけるSRB菌(Desulf. desulfuricans、ATCC 7757)の増殖阻害効果を検証した。この菌の増殖試験は、菌が十分に増殖できるpH7.2(中性領域)、Eh -250mV以下の条件で行った。菌の増殖は培養後菌の増殖に伴う菌体と黒変の濁度を経時的に測定する方法と目視により検知した。この前者の方法は銅イオンが培地成分と結合して紫の色調を示すことから有効であった(写真3.2-1)。また銅イオンの阻害効果は接種菌量を変えて3回行った。その結果をまとめて表3.2-1に示す。

表3.2-1 銅イオンのSRB増殖阻害試験結果

銅イオン濃度 (ppm)	254	127	63.5	25.4	12.7	0
硫酸銅・5水和物 (ppm)	1000	500	250	100	50	0
培養日数						
1	-	-	-	-	-	-
2	-	-	-	-	+	++
3	-	-	-	±	++	++
8	-	-	-	++	++	++

++ : 十分増殖、+ : 増殖、 ± : 僅かな増殖 - : 増殖なし。



写真3.2-1 試験中の特製光度計セル付き嫌気性培養試験管

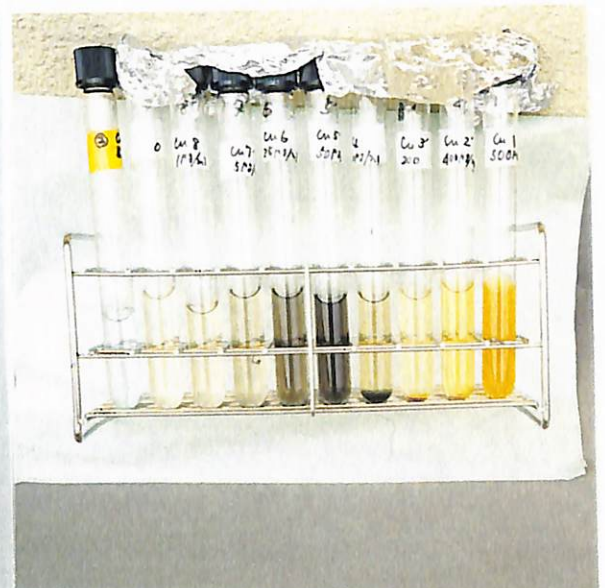


写真3.2-2 銅イオンと培地成分の発色

銅イオンのSRB菌増殖阻害は銅イオンで65~100ppm以上(硫酸銅液約200-300ppm)で完全に阻害される。また銅イオンで50~25ppmにおいてSRB菌の発育遅延効果が認められた。そこで更に接種菌量を少量にして確認試験をした結果、図3.2-1に示すように12.7ppmにおいても発育遅延効果が著明であった。また、25ppmで増殖が60時間で認められなかったものに新たに菌を接種したところ、増殖の速度は遅いが菌の発育が見られた。これは銅イオンと菌体の成分(核酸やポリアミノ酸)との結合による阻害が、銅イオンと結合する菌体の量によって変わることを示唆するものであろう。しかし実際には菌は多数の塊りで存在する場合は少なく、好条件下で初めて増殖すると考えられるので前記の阻害濃度で殆どの場合死滅すると思われる。

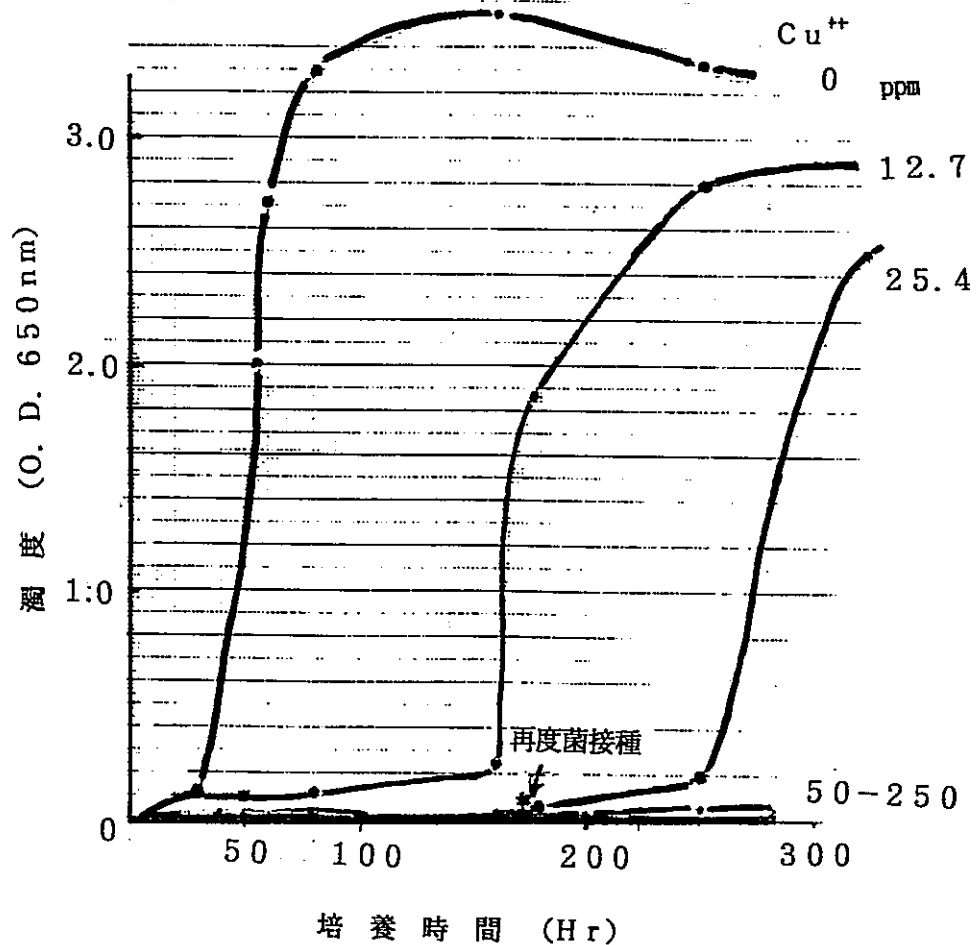


図3.2-1 銅イオンの濃度におけるSRB菌の増殖遅延・阻害効果(濁度測定法)

接種菌量を通常の1/2にして経時的に濁度を測定した。*:接種菌追加。

表3.2-2に他のSRB菌群の銅イオンによる最小阻害濃度（増殖阻害を示す最小濃度）の検索報告例¹⁾（pHは中性）を本試験結果と併せて示すように、硫酸銅の値は20から50ppmであり、今回のSRB菌の結果も同様の濃度で亜鉛などに比べてかなり強く阻害されることが分かった。また、他の菌類の銅イオンの阻害は、表3.2-3に示すように最小阻害濃度が200～400ppmでやや高い程度である²⁾。

表3.2-2 SRB菌群の銅イオンによる最小阻害濃度（増殖阻害を示す最小濃度）

阻害剤	最小阻害濃度 金属イオン(ppm)	菌種	温度 ℃	備 考
硫酸銅	65 - 100	Dd	35	本試験菌
硫酸銅	5 - 30	Dn	55	海洋性 (2.5% NaCl)
	20	Dd	30	
	5 - 50	Dv	30	
	30	Do	30	
銅 8-ヒドロキシ キノリン	250	Dn	55	
	250	Dv	30	
硫酸亜鉛	10、000	Dd	30	還元剤無添加

Dd: *Desulfovibrio desulfuricans*, Dn: *Desulfotomaculum nigrificans*,
Dv: *Desulfovibrio vulgaris*, Do: *Desulfotomaculum orientis*.

PostgateJR (1981)

表3.2-3 他の菌類の銅イオンの阻害濃度比較（最小阻害濃度）

温度：35℃

菌種	銅イオン (ppm)
大腸菌	<i>E. coli</i> 400
緑膿菌	<i>P. aeruginosa</i> 400
サルモネラ	<i>S. typhimurium</i> 400
肺炎桿菌	<i>K. pneumoniae</i> 400
黄色ブドウ球菌	<i>S. aureus</i> 200
マイクロコッカス	<i>M. luteus</i> 400
コリネバクター	<i>C. xerosis</i> 200
枯草菌	<i>B. subtilis</i> 400

高山ら1994

微生物に対する銅イオンの毒性作用については銅イオンが高分子化合物と結合する事が知られており、微生物の生育に必要ないろいろな成分との反応による阻害が報告されている^{3)、4)}。例えば、大腸菌では蛋白質の合成よりもRNAの方が強く阻害される様である。二価の銅イオンは微生物の増殖に重要な核酸の磷酸基との結合により構造体を変成させると

見られている。またしばしば酵素など蛋白質の構造と反応性に役割を担っているSH基に結合することや膜成分と結合して機能を壊すなどが毒性を示す要因と考えられている。

3.3 脱窒細菌及び鉄還元細菌、鉄酸化細菌の耐性領域図作成試験の調査・検討

3.3.1 概要

今回の調査対象の3グループの微生物群は、昨年度までに調査した硫酸塩還元細菌（SRB）、メタン生成細菌（MPB）、硫黄酸化細菌（SOB）と同様、栄養形式でグループ分けしたものである。必ずしも分類学的、系統学的グループと一致しないが、地下環境での微生物生存可能性や核種移行を議論するとき、こういうグループ分けが便利と考える。これらの微生物群は各々次の性質を持つ。

	基質		生成物	反応のための 酸素の条件
	電子受容体	電子供与体		
脱窒細菌	NO_3^- , NO_2^-	有機物など	N_2O , N_2	原則的に無酸素状態が必要
鉄還元細菌	Fe^{3+}	有機物など	Fe^{2+}	原則的に無酸素状態が必要
鉄酸化細菌	酸素	Fe^{2+}	Fe^{3+} 化合物	好気性、微好気性

以下、グループごとに、その概要、種類および基質利用性の調査、pHなど環境条件に対する生息範囲の調査、培地など培養方法の調査、増殖・活性検出方法の調査について結果を述べ、最後に全体をまとめて耐性領域図作成への見通しを考察する。

3.3.2 脱窒細菌

(1) 概要

脱窒とは、イオン状の窒素酸化物（硝酸イオン、 NO_3^- と亜硝酸イオン、 NO_2^- ）の片方または両方を異化的に還元して、ガス状酸化物（一酸化窒素、 NO と一酸化二窒素、 N_2O ）、更には自動的に窒素ガス（ N_2 ）を生成する反応である⁵⁾。その一例を図3.3-1に示すが、有機物、水素などの電子供与体から電子を NO_3^- 、 NO_2^- に移す過程で微生物がエネルギーを得ている。これは基本的に好気性細菌によるもので、酸素が無いときに窒素酸化物が最終の電子受容体として働く⁵⁾。

脱窒は、農地における肥料からの窒素のロス、窒素含有廃棄物の浄化（窒素除去）、温

窒素効果ガスの N_2O の放出、地球の窒素循環のバランスの機構の観点から興味を持たれている⁶⁾。

(2)種類および基質利用性の調査

脱窒細菌は多種多様で、表3.3-1に示すような多くの種類が報告されている⁶⁾。しかし実際の土壌などで重要な役割を果たしているのは、比較的少ない種類に限られているようである。

今から約20年前に米国で脱窒細菌の広範囲な調査が行われた⁶⁾。即ち8カ国から集められた脱窒が起こりやすいと思われる19カ所の土壌、3カ所の淡水湖の底泥および畜産廃棄物から146株の脱窒細菌が単離されグループ分けされた。それによれば最も主要なグループは Pseudomonas fluorescens であり、次いで Alcaligenes 属であった。他の Pseudomonas 属や Flavobacterium 属も同定された。

上記146株の脱窒細菌については微生物にとっての一般的な基質の利用性が調べられた。酢酸は大部分のグループに利用されたが、他の有機酸やアミノ酸、アルコール類、糖類は利用できるグループと利用できないグループがあった(表3.3-2)⁶⁾。メタノールは、Hyphomicrobium にとくに利用される(表3.3-3)⁷⁾。その他、水素⁵⁾や単体硫黄、チオ硫酸、亜硫酸、硫化物⁸⁾も電子供与体として脱窒細菌に利用される。

石油系炭化水素の脱窒細菌による分解については、Oshimaが NO_3^- 含有培地におけるp-ヒドロキシ安息香酸塩、protocatechuateの分解について、TaylorらがPseudomonasによるベンゼン環の開裂について報告している⁹⁾。EvansらはMoraxellaを対象に NO_3^- から N_2 への反応を確認しつつ、 ^{14}C を用いて安息香酸塩の分解経路を調査し図3.3-2に示す経路を提唱した。最終産物の脂肪酸は酢酸、水素、 CO_2 へと分解される⁹⁾。Bakkerは NO_3^- 含有培地におけるフェノールの分解を示し、これが図3.3-3に示す経路によると推定した⁹⁾。Brownらは高速道路のアスファルトのプリスタリングの原因を調査し、分解されたアスファルトの微生物マイクロフロラは、 CO_2 , H_2 , CH_4 , N_2O , N_2 および H_2S を生成することを示した¹⁰⁾。

表3.3-4はその結果の一例で、100 mLのバイアル瓶に25 gのアスファルトと47 mLの培地を加えてガス発生を調べたものであるが、C, N, Pを加えることにより30℃、1週間の培養で検出されるほどのガスが発生した。 N_2O の生成は脱窒の進行を示す。

(3) pHなど環境条件に対する生息範囲の調査

KoskinenらはpH4.6~6.9の土壌のpHの脱窒に対する影響を調べたが、脱窒速度はpHよりも有機Cの無機化速度により影響されるとした。ただし、脱窒の生成物はpHが中性になるほど N_2 の比率が高く、酸性になるほど N_2O あるいは NO の比率が高くなった¹¹⁾。van Cleemputらは浸水土壌懸濁液のpHを4.5, 6, 8また還元電位を0, +200, +400 mVと変化させ硝酸還元への影響を調べたが、pHが高く還元電位が低いほど硝酸還元速度は高くなった。2.5Mradのガンマ線照射はpH中性では硝酸還元をむしろ促進した¹²⁾。Gilliamらは、100gの土壌を0.25 gのグルコース、250 mLの NO_3^-N (20 mg/L)溶液とともにガラス容器に入れ、pHとEhをモニタしながら硝酸濃度の変化を調べ、pH4.5でも硝酸還元が起きることを示した¹³⁾。Timmermansらは排水処理リアクタの微生物を材料に基質をメタノールとし25°Cのバッチテストで脱窒速度に対するpHの影響を調べた。その結果は図3.3-4のとおり、最適pHは8.3であるがpH 10においても脱窒活性が見られた¹⁴⁾。また家禽排水の処理を扱った文献で極端なpH条件(pH4およびpH11)は脱窒に阻害的に働くという記述があり¹⁵⁾、「阻害的とはゼロでない」という解釈からか、Knowlesは脱窒はpH11で起きるかもしれないと述べている⁵⁾。

Keeneyらは、土壌の脱窒に対する温度の影響を調べ、60~67°Cが最適という結論を得た(表3.3-5)¹⁶⁾。しかし、これは単離株で調べたものでないので、試験中に好熱性脱窒細菌が増加してこういう結果になった可能性もある。一方低温側では5°Cでの脱窒が低速であるが確認されている¹³⁾。

脱窒に対する酸素の影響としては、*Paracoccus*を材料に、酸素の存在が N_2O から N_2 への反応を抑え、また更に高濃度になると図3.3-1の代謝経路の N_2O の更に上流側で反応が阻害されるらしいこと(図3.3-5)が示された¹⁷⁾。

(4) 培地など培養方法の調査

脱窒細菌は本来好気性細菌であり、酸素欠乏のとき酸化型窒素を還元する能力を持ったものであるから、ヘッドスペースを嫌気性ガスに置換したり培地に還元剤を加えるなどの培養開始時の嫌気性操作は必ずしも必要なものではない¹⁸⁾。培養方法の一例¹⁹⁾では、次のように操作する。

- (i) シリンジを用いて気体の注入と採取ができる密栓付きの試験管など(図3.3-6)に培地を分注し、滅菌する。

(ii) 微生物試料を接種する。

(iii) 密栓後、ヘッドスペースにアセチレンを0.1 atmになるようにシリンジで注入する
(アセチレンを添加する理由は後述)

(iv) 25~30°Cで14日間培養する。

(v) ヘッドスペースの N_2O (後述のとおりアセチレン添加により蓄積する) をガスクロマトグラフで分析するなどして、脱窒活性を確認する。

また単離をする場合は次のように操作する¹⁹⁾。

(i) 寒天培地の平板 (ペトリ皿) を用意し微生物を接種ののち、窒素ガスを満たしたデシケータ中で30°Cで培養する。または、平板上に0.9%寒天を重層して30°Cで培養する。

(ii) 生じたコロニーを上述のような液体培地に移植し、培養して、脱窒活性を調べる。

培地の例を表3.3-6¹⁹⁾、表3.3-7¹⁹⁾、表3.3-8¹⁴⁾ および表3.3-9¹⁷⁾ に示す。脱窒細菌の中には NO_3^- を利用できないが NO_2^- を利用して脱窒するものがある。それらの培養のため培地のN源として亜硝酸塩を用いることも試みられた²⁰⁾。しかし、この方法は、 NO_2^- が NO_3^- 還元に対し阻害的であること⁵⁾ ためか一般的には用いられていない。

(5) 増殖・活性検出方法の調査

脱窒細菌の純粋培養の増殖は、濁度などで測定できる。しかし、今までの脱窒の研究の多くは土壌からの窒素のロスなど実用的な面について行われてきた。その場合、脱窒反応の生産物である N_2O と N_2 の正確な測定による脱窒活性の評価は、 N_2 が多量に空気のバックグラウンドとして存在し混入の可能性があるので、実際上むずかしい⁵⁾。そこで、脱窒活性を測定するために次のようないくつかの手法が用いられてきた。

(i) 窒素酸化物の消失で測定する方法

NO_3^- 、 NO_2^- の減少量から脱窒量を求める方法だが、窒素酸化物から NH_4^+ の生成が起きている場合は、脱窒量を表わさない⁵⁾。

(ii) ^{15}N を用いる方法

$^{15}NO_3^-$ を系に添加し、放出される $^{15}N_2O$ や $^{15}N_2$ をマススペクトロメータで測定する方法である。例えば図3.3-7のような密閉された系に、 $Na^{15}NO_3$ を加えた土壌と

アルカリ溶液 (CO₂の妨害を防ぐため) を入れ、培養し、ガスをサンプリングしてマススペクトロメータで測定する²¹⁾。なお、¹⁵NO₃⁻を使う方法もある⁶⁾。

(iii) アセチレン阻害法

アセチレン (C₂H₂) は脱窒の過程でN₂Oの還元を阻害することが報告されている。これは、いくつかの脱窒細菌の純粋培養で確認された¹⁾。土壌におけるN₂O還元の阻害は10⁻³気圧のアセチレンで完全であり、NO₃⁻は完全にN₂Oに変換した (図3.3-8)^{22) 23)}。これは土壌^{28) 19)} や海洋底泥²⁴⁾ での簡便な脱窒活性測定法の提唱へと至り、¹⁵N法との相関性も確認されている²⁶⁾。なおアセチレン阻害法の実験装置の一例を図3.3-9²⁶⁾ に示す。アセチレン阻害法についての若干の経験²⁷⁾ によれば、本法ではC₂H₂を加える際の雑菌混入防止 (滅菌フィルタで濾過するなどの工夫が必要) やC₂H₂の爆発危険性への対応など配慮が必要である。脱窒活性を示すN₂Oの検出は、ガスクロマトグラフ (検出器TCD) で可能である (図3.3-10²⁷⁾)。

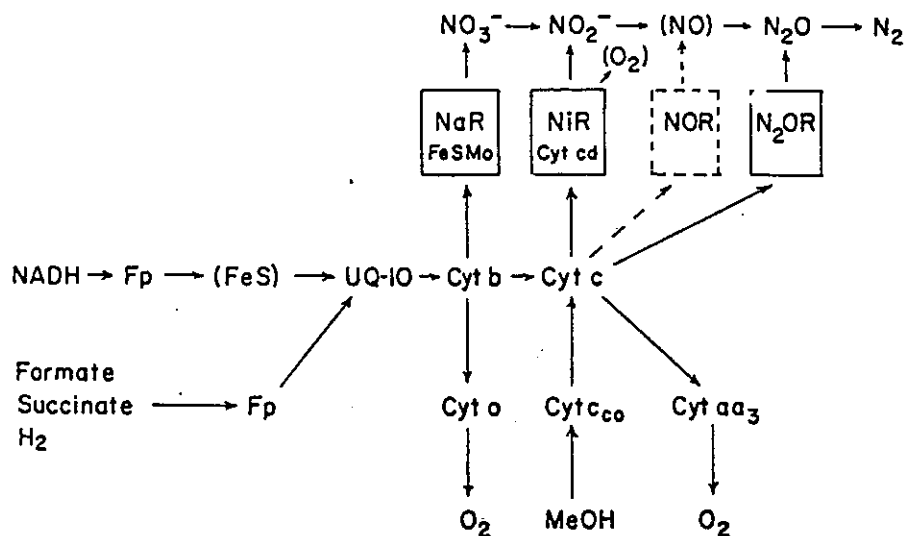


図3.3-1 脱窒細菌の代謝モデル⁵⁾

(NaR:NO₃-reductase, NiR:NO₂-reductase, N₂OR:nitrous oxide reductase)

表3.3-1 報告されている脱窒細菌の種類と特徴⁵⁾

属名	特徴
<u>Achromobacter</u>	メタン酸化脱窒細菌を含む。NO ₂ ⁻ からの脱窒を行う種類もいる。
<u>Agrobacterium</u>	
<u>Alcaligenes</u>	H ₂ , CO ₂ , NO ₃ ⁻ で集積されるものもいる。
<u>Bacillus</u>	水田で重要。
<u>Chromobacterium</u>	
<u>Corynebacterium</u>	最終産物としてN ₂ Oを生成する。
<u>Flavobacterium</u>	
<u>Halobacterium</u>	死海から単離された。
<u>Hyphomicrobium</u>	メタノールを利用して脱窒する。
<u>Moraxella (Kingella)</u>	安息香酸を利用して脱窒する。
<u>Neisseria</u>	多くはNO ₂ ⁻ から脱窒する。
<u>Paracoccus (Micrococcus)</u>	H ₂ の利用ができる。
<u>Propionibacterium</u>	
<u>Pseudomonas</u>	土壌や水域で最も普遍的な脱窒細菌の種類を含む
<u>Rhodopseudomonas</u>	
<u>Thiobacillus</u>	還元型硫黄の酸化と脱窒を行う。
<u>Vibrio</u>	ガスは出さないがN ₂ O reductaseを持っている。
<u>Xanthomonas</u>	

表3.3 -2 グループ分けした単離株の基質利用性⁶⁾

Group	Sugars ^b										Alcohols ^b				Amino acids ^c				Acids ^c						
	D-Glucose	Sucrose	D-(+)-Trehalose	L-Arabinose	D-Arabinose	D-Fructose	D-Xylose	D-Ribose	Maltose ^c	D-(+)-Cellulbiose ^c	Ethanol	Propylene glycol	D-Sorbitol	Geraniol ^d	meso-Inositol	L-Asparagine	DL-Arginine	Sarcosine	β-Alanine	Acetate	Propionate	p-Hydroxybenzoate	2-Ketogluconate	Saccharate	Citrate
1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
1A	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
1B	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
1C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
1D	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5B	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
9	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
10	+	+	-	+	-	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+

^a Numbers in parentheses refer to references from which the methods were obtained.

^b 1.0% solution (g/ml), unless indicated otherwise.

^c 0.1% solution (g/ml).

^d e, Entire; u, umbonate; n, undulate.

^e c, Convex; e, erose.

^f s, Smooth; r, rough; f, ruffled.

^g b, Buttery; m, mucoid.

^h g, Glistening; d, dense; t, translucent; o, opaque.

ⁱ c, Cream; g, gray; bg, blue-green; w, white; py, pale yellow; by, bright yellow; b*, blue diffusible pigment on peptone-glucose medium (28); v, variable.

^j See text for description of preparation.

表3.3-3 Hyphomicrobiumによるメタノールの利用⁷⁾

TABLE 1. Rates of nitrogen production from nitrate by strains of *Hyphomicrobium*^a.

Substrate	Rate ^a	
	Strain B522 ^c	Strain WC ^d
Methanol	72.3	15.4
Formaldehyde	19.5	13.2
Formate	19.1	11.6
Methylamine	11.3	2.8
Ethanol	14.7	14.9
Endogenous	9.9	2.3

^a Cell suspensions (6 to 7 mg of protein) were incubated, at their respective pH optima, in the presence of substrates indicated (20 μmoles) as described in Materials and Methods.

^b Microliters of N₂ produced per milligram of protein per hour.

^c At optimum pH on methanol, 6.5.

^d At optimum pH on methanol, 7.5.

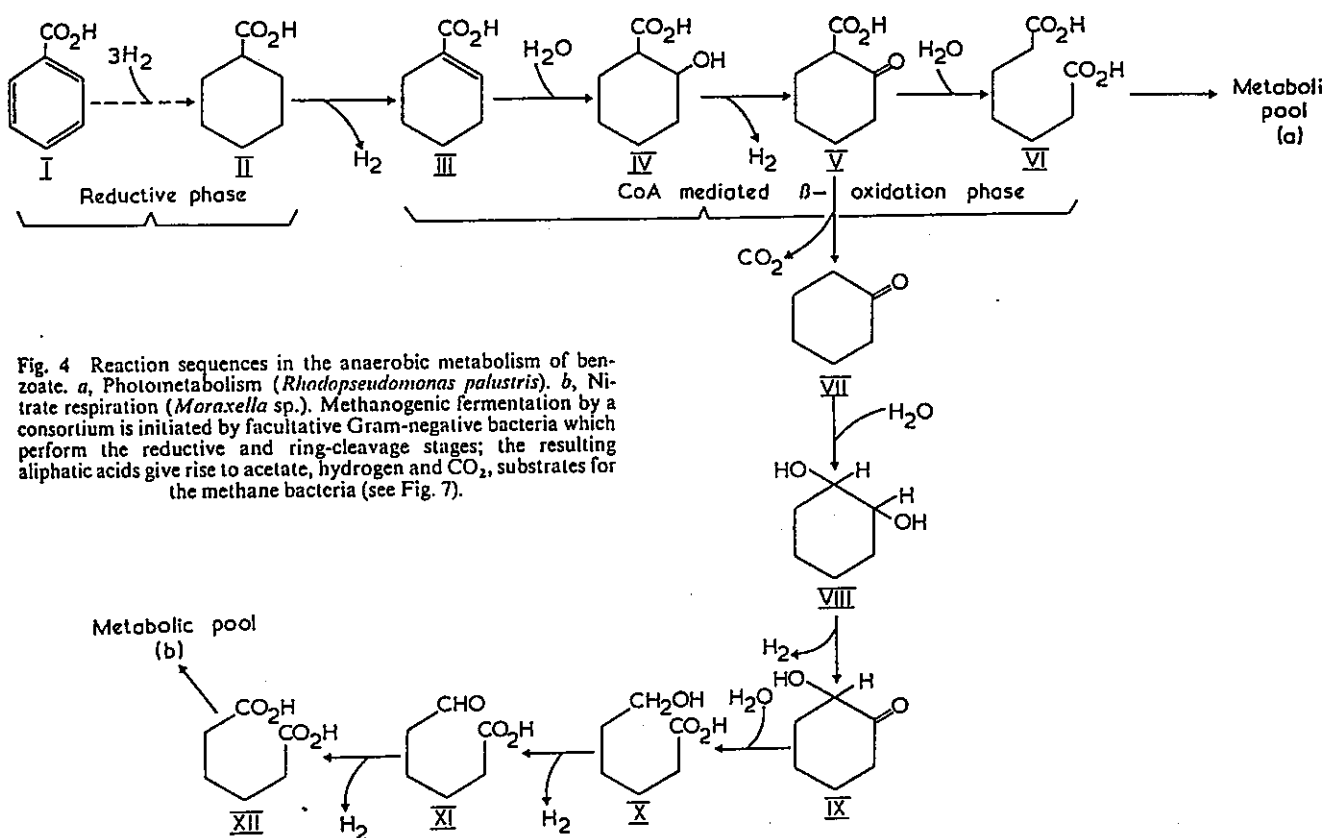


Fig. 4 Reaction sequences in the anaerobic metabolism of benzoate. a, Photometabolism (*Rhodospseudomonas palustris*). b, Nitrate respiration (*Moraxella* sp.). Methanogenic fermentation by a consortium is initiated by facultative Gram-negative bacteria which perform the reductive and ring-cleavage stages; the resulting aliphatic acids give rise to acetate, hydrogen and CO₂, substrates for the methane bacteria (see Fig. 7).

図3.3-2 脱窒細菌による安息香酸塩の分解経路⁹⁾

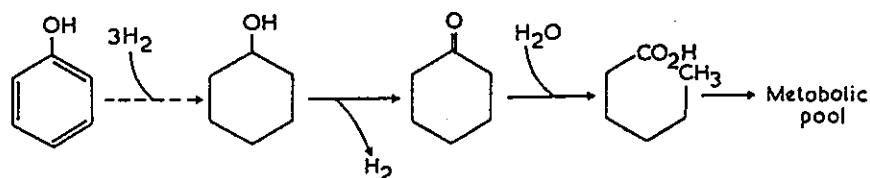


Fig. 6 Anaerobic metabolism of phe through n-caproate by a consortium in presence of nitrate. Initial reduction accomplished by an unidentified hydrogen donor (dox potential -0.42 V).

図3.3-3 脱窒細菌によるフェノールの分解経路⁹⁾

表3.3-4 栄養塩を添加したアスファルトからのガス発生¹⁰⁾

Table 2. Analysis of asphalt for availability of carbon, nitrogen, and phosphorus.

Sample Mix	No. of Samples Analyzed	CO ₂ Produced (μl)	H ₂ S Produced (μl)	N ₂ O Produced (μl)	pH (units)	Anaerobes (No./ml)
A	2	48	0	0	7.18	--
AP	2	33	0	0	7.16	--
AN	2	36	0	0	7.11	--
AC	2	45	0	0	6.38	--
APN	2	27	0	0	6.97	--
APC	2	54	0	0	6.91	--
ANC	2	48	0	0	6.40	--
APNC	4	4903	808	361	6.37	7.4 x 10 ⁶
P	2	33	0	0	7.27	--
N	2	24	0	0	6.96	--
C	2	36	0	0	6.47	--

A = asphalt

P = K₂HPO₄ added

N = NH₄NO₃ added

C = glucose added

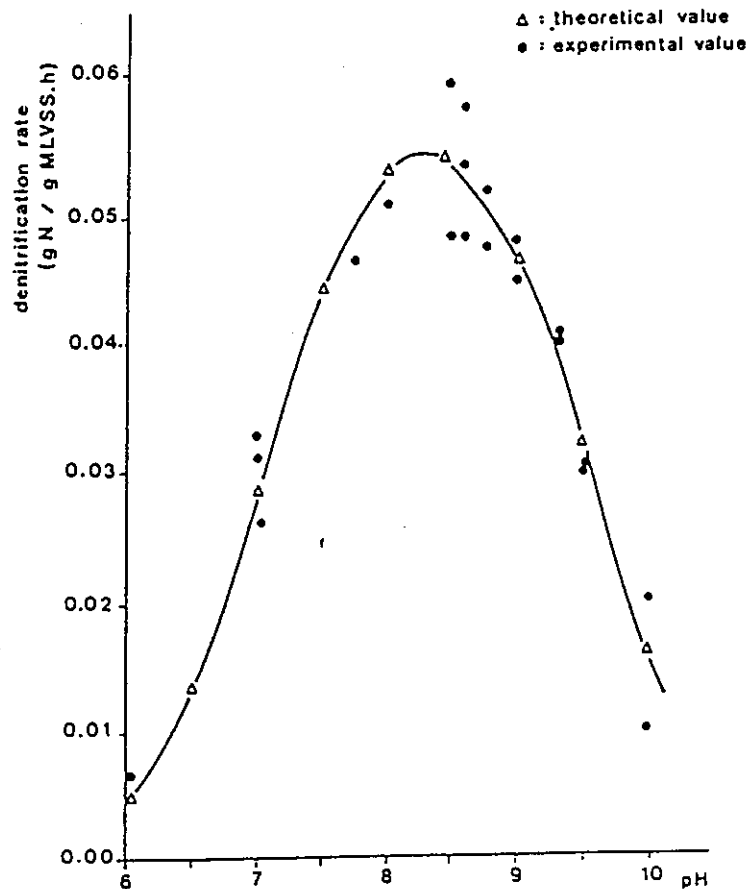


図3.3-4

pHが
脱窒速度に
及ぼす影響¹⁴⁾

Fig. 1. Denitrification rate of *Hyphomicrobium* spp as a function of pH. Temperature = 25°C.

表3.3-5 温度が脱窒速度に及ぼす影響¹⁶⁾

Table 3—Nitrogen balance at end of the incubation.

Temp. °C	Total incubation time days	Nitrite + nitrate-N —— % of initial NO ₃ -N in system† ——	Gaseous N	Sum
7	16	91 ± 2	11 ± 0	102 ± 2
15	16	93 ± 5	12 ± 1	104 ± 2
25	16	61 ± 6	44 ± 7	104 ± 1
40	4	34 ± 2	63 ± 7	97 ± 8
50	4	0	125 ± 4	125 ± 4
60	4	0	134 ± 3	134 ± 3
65	4	0	127 ± 6	127 ± 6
67	4	0	143 ± 11	143 ± 11
70	4	0	109 ± 31	109 ± 31
75	4	98 ± 7	0	98 ± 7

† 6.09 mg NO₃-N/50 g soil.

図3.3-5

酸素が
脱窒の中間
産物蓄積に
及ぼす影響¹⁷⁾

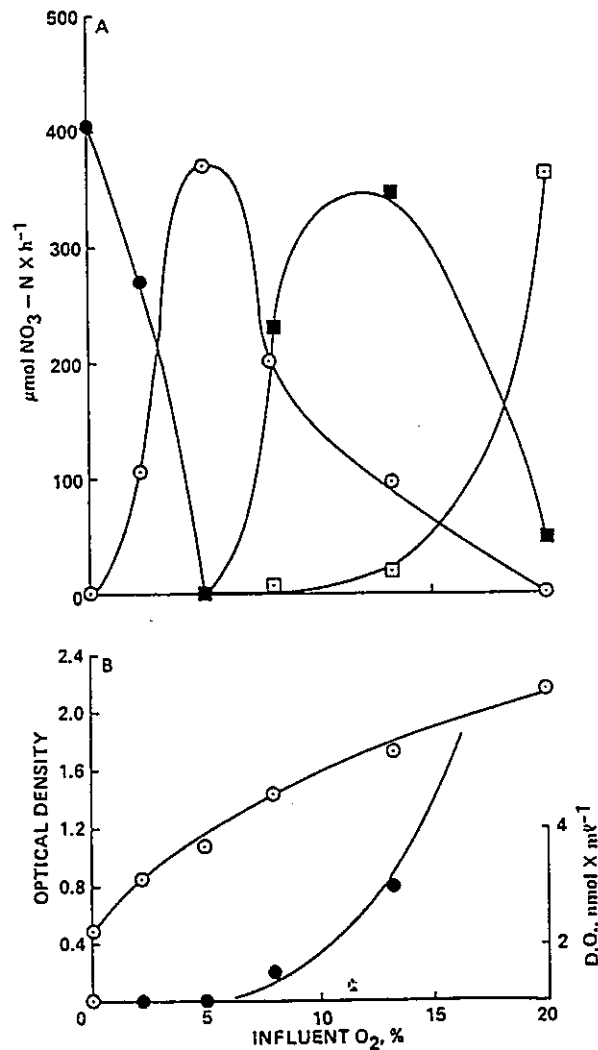


Fig. 1. Denitrification during nitrate-limited steady-state growth. (a) After steady states were attained at the indicated oxygen concentrations, the effluent gas stream was sampled for dinitrogen (●) and nitrous oxide (○) while the growth medium was assayed for nitrite (■) and nitrate (□). (b) The dissolved oxygen concentration (●) and the turbidity (○). The concentration of nitrate in the reservoir was 10 mM which translates to a flow of 460 μmol of nitrate-nitrogen h^{-1}

図3.3-6

気体の注入と
採取が可能な
試験管

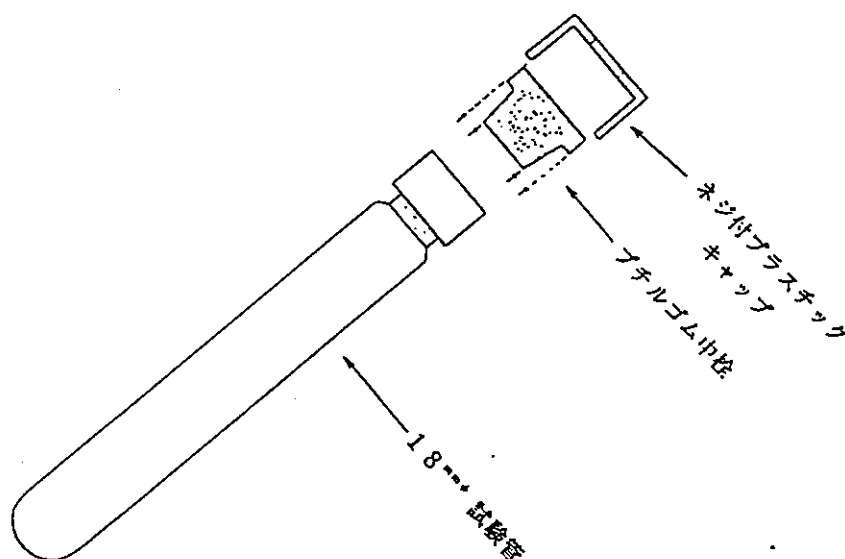


表3.3-6 脱窒細菌の培地の例¹⁹⁾
(硝酸塩肉エキス培地)

肉エキス	3.0 g
ペプトン	5.0 g
KNO ₃	0.5 g
蒸留水	1,000 mL

表3.3-7 脱窒細菌用培地の例¹⁹⁾
(Gilteyの培地)

A溶液

KNO ₃	1.0 g
アスパラギン	1.0 g
1%プロムチモールブルー・アルコール溶液	5 mL
蒸留水	500 mL

B溶液

クエン酸ナトリウム	8.5 g
MgSO ₄ ・7H ₂ O	1.0 g
FeCl ₃ ・6H ₂ O	0.05 g
KH ₂ PO ₄	1.0 g
CaCl ₂ ・6H ₂ O	0.2 g
蒸留水	500 mL

A, B 両液を混合する。

表3.3-8 脱窒細菌の培地の例¹⁴⁾
(*Hyphomicrobium*用培地)

NaNO ₃	max. 500 mgN/L
CH ₃ OH	max. 800 mg/L
KH ₂ PO ₄	35 mg/L
MgCl ₂ ・6H ₂ O	2 mg/L
FeCl ₂ ・6H ₂ O	2 mg/L
CaCl ₂ ・6H ₂ O	2 mg/L
MgSO ₄ ・7H ₂ O	4 mg/L
微量元素 ²⁸⁾	

表3.3-9 脱窒細菌の培地の例¹⁷⁾
(*Paracoccus*用培地)

NaCl	1 M
K ₂ HPO ₄	50 mM
Na lactate	45 mM
MgSO ₄	0.4 mM
KNO ₃	10 mM
(NH ₄) ₂ SO ₄	< 15 mM
Thiamine/HCl	1.5 μM
L-methionine	94 μM
FeSO ₄	1.1 μM

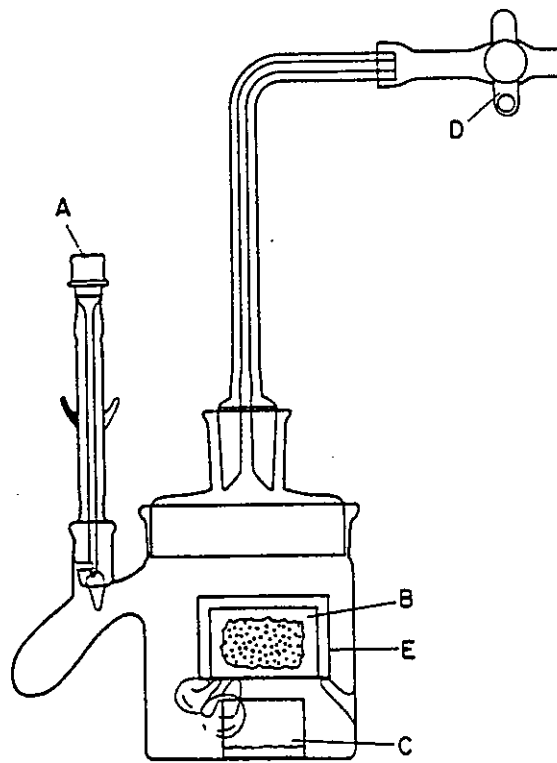


Fig. 1—Incubation vessel used in the study with serum cap (A), pinch clamp (D), and alkali well (D). The soil core (B) was contained within the glass vessel (E).

図3.3 - 7 ^{15}N による脱窒活性測定に用いられた容器の例²¹⁾

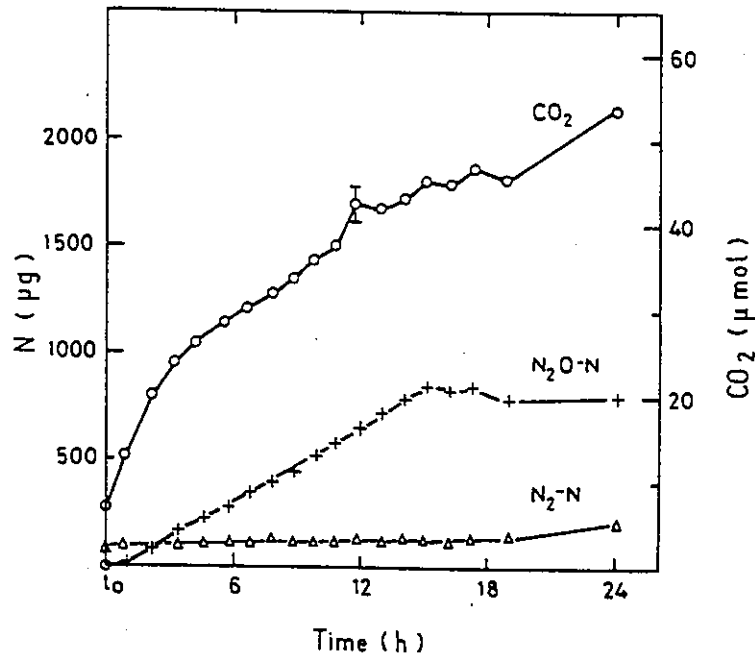


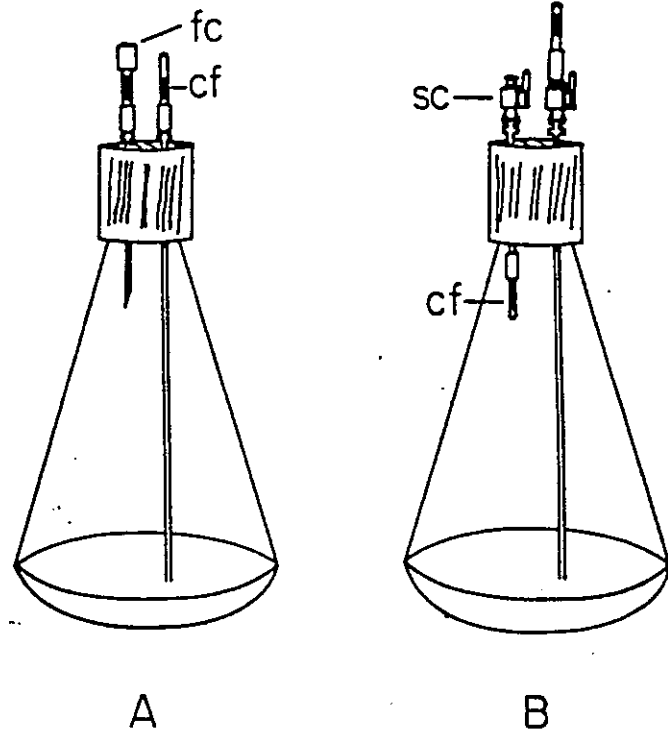
Fig. 1. Gas production at 28°C in bottles with 40 g air dried mineral soil to which water (200% WHC) and nitrate (1600 μg N) had been added. The atmosphere was He with 0.1 atm C₂H₂. Values are means of triplicates. Bars indicate S.E.

図3.3 - 8 アセチレン阻害法を用いたときの生成ガスの組成²³⁾

図3.3-9

アセチレン阻害
法に用いられた
実験装置の例²⁶⁾

FIG. 1. Flasks used in growing *N. rhodochrous* on acetylene gas. (A) Flask for routine cell cultivation; (B) flask allowing quantitative sampling of the head-space gas. cf, Cotton filter; sc, stopcock; fc, filter cap. For detailed description see text.



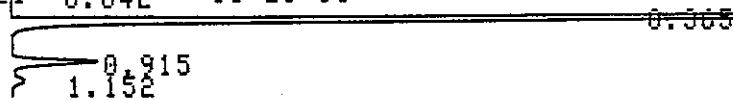
CHROMATOPAC C-R6A
SAMPLE NO 0
REPORT NO 1949

FILE 1
METHOD 44
SAMPLE WT 100

PKNO	TIME	AREA	MK	IDNO	CONC	NAME
1	0.035	30				
2	0.362	1318725		1	70.4568	N2
3	0.913	31448		3	1.8485	CO2
4	1.148	16320	V	4	0.956	N2O
TOTAL		1366522			73.2613	

START

95/02/21 0.042 11:21:56



CHROMATOPAC C-R6A
SAMPLE NO 0
REPORT NO 1950

FILE 1
METHOD 44
SAMPLE WT 100

PKNO	TIME	AREA	MK	IDNO	CONC	NAME
1	0.042	28				
2	0.365	1310144		1	69.9984	N2
3	0.915	54041		3	3.1765	CO2
4	1.152	9683	V	4	0.5672	N2O
TOTAL		1373896			73.7421	

図3.3-10 脱窒活性測定のためのガスクロマトグラフによるN₂O分析例²⁷⁾

3.3.3 鉄還元細菌

(1) 概要

鉄の還元は、有機物のCO₂への酸化のための機構として地球化学的に重要とされている。いくつかの微生物が鉄を還元する能力を有することが19世紀から知られていたが、微生物学者でさえ最近まで鉄の還元の大部分は酵素によらない反応によると考えていた。しかし、有機物をCO₂に完全酸化しつつFe(III)を唯一の電子受容体として還元してエネルギーを得る微生物の報告以来、これらの微生物が底泥環境での鉄の還元の大部分に関与していることが明らかになりつつある²⁹⁾。鉄還元細菌は図3.3-11に示すように自然界の有機物分解に広くかかわっている。なおFe(III)の還元とMn(IV)の還元は、反応の場や微生物に類似する面があり同じ項で扱われることが多い。

(2) 種類および基質利用性の調査

鉄還元細菌の報告されている種類を表3.3-10に示す。この中には、鉄還元反応のみでエネルギーを獲得するのではなく、他の栄養形式の微生物が鉄還元もするというケースがかなり多い。例えば、発酵によりエネルギーを得ている大腸菌(*Escherichia*)やクロストリディウム(*Clostridium*)も鉄還元をする(表3.3-10)。Vibrioは、グルコースやリンゴ酸の還元力の0.13~0.03%をFe(III)に伝達しているにすぎない。

むしろグルコースなどよりも、酢酸や芳香族炭化水素を分解する鉄還元細菌²⁹⁾の方が地球化学的には注目されているようである。例えば、海洋底泥の試料では酢酸の消費とFe(II)の生成、および細胞の増加がカップルしているし、これはCO₂生成とも対応している(図3.3-12)³⁰⁾。そして図3.3-13に示すように純粋培養の株でもこの反応は確認された³¹⁾。芳香族炭化水素系では3,4-ヒドロキシ安息香酸による集積培養で図3.3-14に示すように滅菌系を対照としてFe(II)の生物学的生成が確認された³²⁾。Lovleyらは、いろいろな基質を用いたときの鉄還元を比較している(表3.3-11)。

(3) pHなど環境条件に対する生息範囲の調査

鉄還元細菌とpHの関係の調査例は極めて少ない。LovleyらはGS-15株を初期pH5, 6, 7, 8, および9に設定して培養実験したが、鉄還元を確認できたのはpH 7の時のみであった³¹⁾。鉄還元細菌は一般にpH 7前後で培養される場合が多い^{33) 34)}。また、硫黄を基質とする鉄還元細菌の*Thiobacillus thiooxidans*はpH 1.6で培養された³⁵⁾。

温度の影響の調査例を図3.3-15³¹⁾ および図3.3-16³⁶⁾ に示した。この場合の至適温度は30～35℃であったが、Sulfolobusのように70℃で培養されるものもある³⁵⁾。

また還元電位に関連する項目の影響としてArnold³⁷⁾ らは高い酸素濃度が鉄還元を抑えること(図3.3-17)を、Obekuwe³⁸⁾ らはNO₃⁻が鉄還元を抑えること(図3.3-18)を示した。

(4) 培地など培養方法の調査

鉄還元細菌の培地としてはあまり標準化されておらず、いろいろなものが使われているようである。それらを表3.3-12、表3.3-13、表3.3-14、表3.3-15に示す。培養方法は、Alteromonasの例では次のとおりである。即ち、培地の9 mLを密閉試験管(例えば図3.3-6)に入れるか、または培地の100 mLを容量160 mLのバイアル瓶に入れ、ヘッドスペースをN₂+CO₂ガスで置換ののち滅菌する。そののち電子供与体を加え30℃で暗所で培養する。適宜内容をシリンジで抜き出してFe(II)などを分析し、鉄還元活性を評価する³³⁾。

なお表3.3-10から示唆されるように培養中のpH低下³⁴⁾には注意が必要である。

(5) 増殖・活性検出方法の調査

鉄還元細菌の純粋培養における増殖の測定は、濁度による例はほとんど無い。(方法のところでのみ述べられている文献³⁷⁾はある。)おそらく、培養のためFe(III)を用いるので、その濁りと細菌の濁りとの区別が困難なためであろう。菌数測定としては、顕微鏡による測定^{31) 33) 35)}や培養法による測定³⁶⁾が行われている。寒天培地では、コロニー周囲のFe(III)脱色によるクリアなゾーンの形成をもって鉄還元細菌を検出する例もある²⁹⁾。

一方、純粋培養においても、自然の系においても生成物であるFe(II)濃度の測定は有力な活性検出手段である^{31) 33) 36) 38)}。代表的なFe(II)分析法としてフェロジン(Ferrozine)法があり⁴⁰⁾ 広く用いられている。鉄還元細菌は、鉄還元以外の代謝をすることも多い²⁹⁾のでFe(II)の分析は重要となる。

鉄還元は大部分生物学的であると言われていたとはいえ、化学的鉄還元との区別をつける必要がある。そこで、実験ではFe(II)生成の測定だけでなく細胞数増加を測定したり滅菌系との比較する例が多い^{30) 31) 32)}。

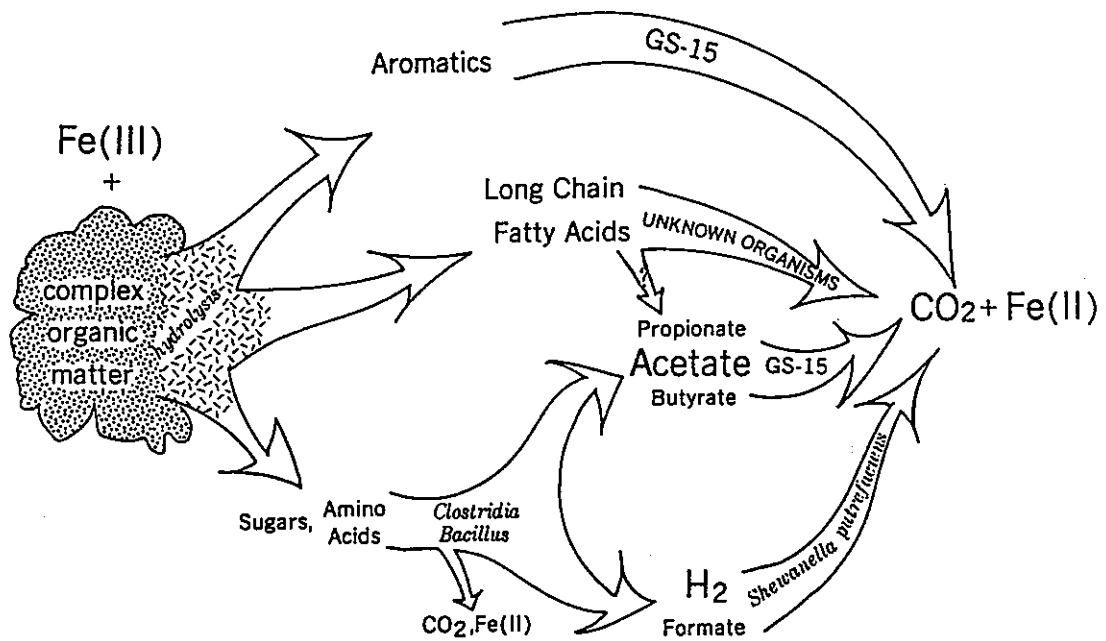


FIG. 1. Model for the oxidation of complex organic matter with Fe(III) serving as the sole electron acceptor, with examples of the organisms that may catalyze the various reactions. A similar model may also apply in sediments in which Mn(IV) reduction is the terminal electron-accepting process.

図3.3 - 11 自然界の有機物分解における鉄還元細菌の役割²⁹⁾

表3.3 - 10 報告されている鉄還元細菌の種類と物質代謝²⁹⁾

属名	基質	代謝
<u>Bacillus</u>	グルコース	$C_6H_{12}O_6 + 24 Fe(III) + 12 H_2O \rightarrow 6 HCO_3^- + 24 Fe(II) + 30 H^+$
<u>Vibrio</u>	グルコース リンゴ酸塩	
<u>Escherichia</u>	グルコース またはペプトン	
<u>Clostridium</u>	同上	
<u>Lactobacillus</u>		
<u>Thiobacillus</u>	単体硫黄	$S^0 + 6Fe(III) + 4H_2O \rightarrow HSO_4^- + 6Fe(II) + 7H^+$
<u>Sulfolobus</u>	単体硫黄	$S^0 + 6Fe(III) + 4H_2O \rightarrow HSO_4^- + 6Fe(II) + 7H^+$
<u>Pseudomonas</u>	水素	$H_2 + 2Fe(III) \rightarrow 2H^+ + 2Fe(II)$
<u>Shewanella</u>	水素	$H_2 + 2Fe(III) \rightarrow 2H^+ + 2Fe(II)$
(<u>Alteromonas</u>)	蟻酸	$formate^- + 2Fe(III) + H_2O \rightarrow HCO_3^- + 2Fe(II) + 2H^+$
G S 15株	酢酸	$acetate^- + 8Fe(III) + 4H_2O \rightarrow 2HCO_3^- + 8Fe(II) + 9H^+$
	芳香族	$benzoate^- + 30Fe(III) + 19H_2O \rightarrow 7HCO_3^- + 30Fe(II) + 36H^+$
	炭化水素	$toluene + 36Fe(III) + 21H_2O \rightarrow 7HCO_3^- + 36Fe(II) + 43H^+$

表3.3-11 いろいろな基質を用いたときの鉄還元と比較

(inoc:有菌、 uninoc:無菌)

Table I. Fe(III) Reduction in Enrichment Cultures (Inoculated) and Sterile Controls (Uninoculated) with Various Organic Compounds or Hydrogen as the Sole Electron Donor and Poorly Crystalline Iron(III) Oxide as a Potential Electron Acceptor

electron donor ^a	Fe(II) produced after incubation, ^b mmol/L			electron donor ^a	Fe(II) produced after incubation, ^b mmol/L				
	7 days	14 days	21 days		7 days	14 days	21 days		
hydrogen	(inoc) ^c	40.1	44.4	45.8	fructose	(inoc)	16.0	23.4	25.6
	(uninoc)	0.0	0.0	0.0		(uninoc)	4.3	4.1	6.2
formate	(inoc)	12.6	19.7	19.2	lysine	(inoc)	18.3	24.3	25.0
	(uninoc)	0.0	0.0	0.0		(uninoc)	0.0	0.0	0.0
pyruvate	(inoc) ^d	8.3	13.1	14.9	serine	(inoc)	30.8	38.6	40.3
	(uninoc)	0.0	0.0	0.0		(uninoc)	0.3	0.0	0.0
acetate	(inoc) ^e	21.6	31.2	33.3	aspartate	(inoc)	13.9	18.8	20.9
	(uninoc)	0.0	0.0	0.0		(uninoc)	0.0	0.0	0.0
ethanol	(inoc) ^e	28.8	44.1	45.5	glycine	(inoc)	3.4	10.2	14.6
	(uninoc)	0.0	0.0	0.0		(uninoc)	-0.8	-0.8	-0.8
glycerol	(inoc)	18.8	27.6	25.4	benzaldehyde	(inoc) ^e	7.0	9.8	10.1
	(uninoc)	-0.3	-0.3	-0.3		(uninoc)	-0.3	0.3	0.7
lactate	(inoc) ^d	3.6	7.5	17.2	benzyl alcohol	(inoc) ^e	10.1	19.1	19.1
	(uninoc)	0.0	0.0	0.0		(uninoc)	-0.4	-0.4	1.4
propionate	(inoc) ^e	10.3	18.3	22.2	p-hydroxybenzoate	(inoc) ^e	3.3	6.4	7.0
	(uninoc)	0.0	0.0	0.0		(uninoc)	-0.4	-0.1	0.3
butyrate	(inoc) ^e	10.4	20.7	27.2	p-hydroxybenzylaldehyde	(inoc) ^e	3.2	5.6	6.4
	(uninoc)	0.0	0.0	0.0		(uninoc)	NA	NA	-0.7
malate	(inoc)	16.3	18.5	22.9	p-hydroxybenzyl alcohol	(inoc) ^e	4.1	9.0	10.1
	(uninoc)	-0.4	-0.4	-0.4		(uninoc)	NA	NA	-0.7
succinate	(inoc)	15.4	27.1	23.9	tyrosine	(inoc)	NA	6.4	9.1
	(uninoc)	0.0	-0.1	-0.1		(uninoc)	NA	NA	-0.8
citrate	(inoc)	24.1	30.4	29.9	phenyl acetate	(inoc)	NA	11.1	12.3
	(uninoc)	0.0	0.0	0.0		(uninoc)	NA	NA	0.4
glucose	(inoc)	16.9	19.8	20.0					
	(uninoc)	0.2	0.0	0.0					

^a All organic electron donors were provided at 10 mM initial concentration except for aromatic compounds, which were provided at 0.5 mM. Hydrogen was provided as 0.5 atm in the headspace. ^b Amount of Fe(II) produced was calculated by subtracting the initial concentration of Fe(II) from the values on subsequent days. Values are means of duplicate determinations on duplicate culture tubes of each treatment. NA, not analyzed at that time point. ^c Unless otherwise noted, inoculated with a purified Fe(III)-reducing enrichment culture that had been established with the particular electron donor and transferred at least 20 times prior to the measurements reported here. ^d Inoculated with *Alteromonas putrefaciens*. ^e Inoculated with strain GS-15.

Figure 3. A: Cell growth associated with acetate metabolism coupled to Fe(III) reduction. B: Production of $^{14}\text{CO}_2$ from [2- ^{14}C]-acetate in relation to production of Fe(II) from Fe(III) reduction.

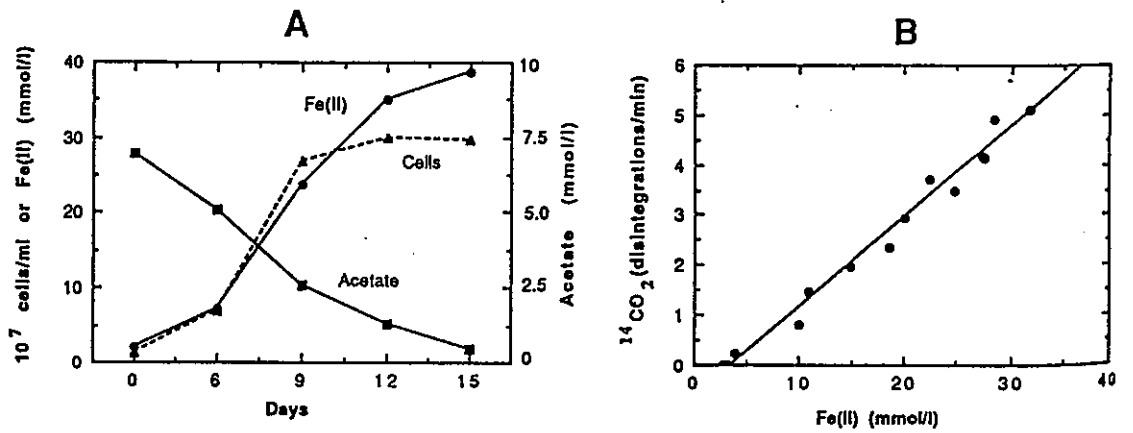


図3.3-12 酢酸消費、細胞増加と鉄還元の関係

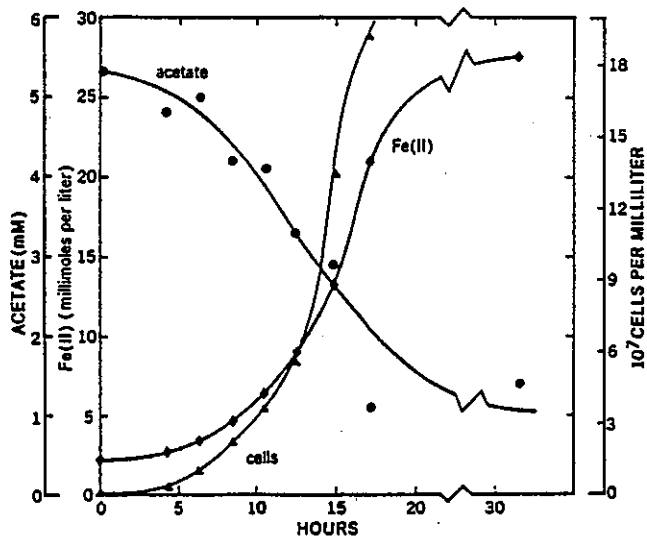


FIG. 4. Concentrations of acetate, cell numbers, and Fe(II) over time in FWA-Fe(III)-citrate medium inoculated with GS-15 that had been grown in FWA-Fe(III)-citrate medium.

図3.3-13

純粋培養株での酢酸消費、細胞増加と鉄還元の関係

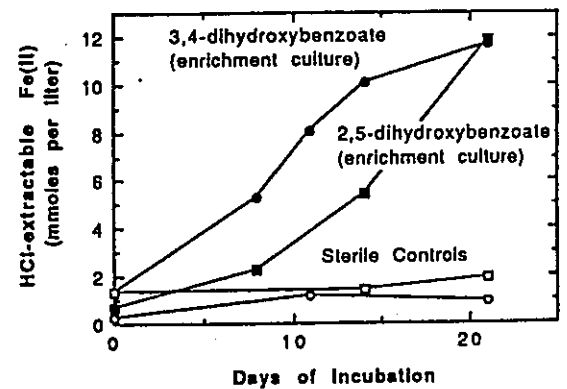


Figure 2. Fe(III) reduction in iron(III) oxide enrichment cultures with 0.5 mM of either 3,4-dihydroxybenzoate (closed circles) or 2,5-dihydroxybenzoate (closed squares) as the sole electron donor. Open symbols are for the corresponding sterile controls.

図3.3-14

3,4-ヒドロキシ安息香酸集積培養での鉄還元

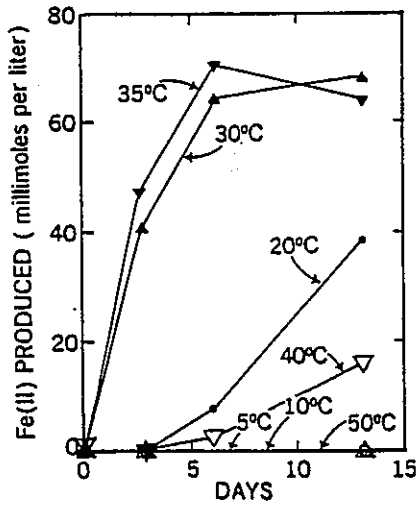


FIG. 2. Fe(III) reduction by GS-15 in FWA-Fe(III) medium incubated at various temperatures.

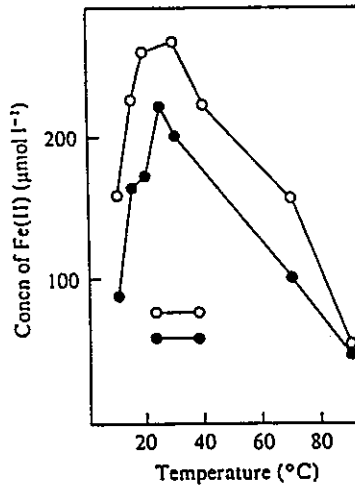


Fig. 3. Effect of temperature on the release of Fe(II) from profundal sediments of Blelham Tarn. Samples were incubated in serum bottles for 23 h (●) and 96 h (○) under an atmosphere of 95% N₂/5% CO₂. The horizontal lines indicate Fe(II) release at 30 °C over the same time periods after treatment with HgCl₂ at a final concentration of 100 mg l⁻¹.

図3.3-15

温度が鉄還元にはぼす影響

図3.3-16

温度が鉄還元にはぼす影響

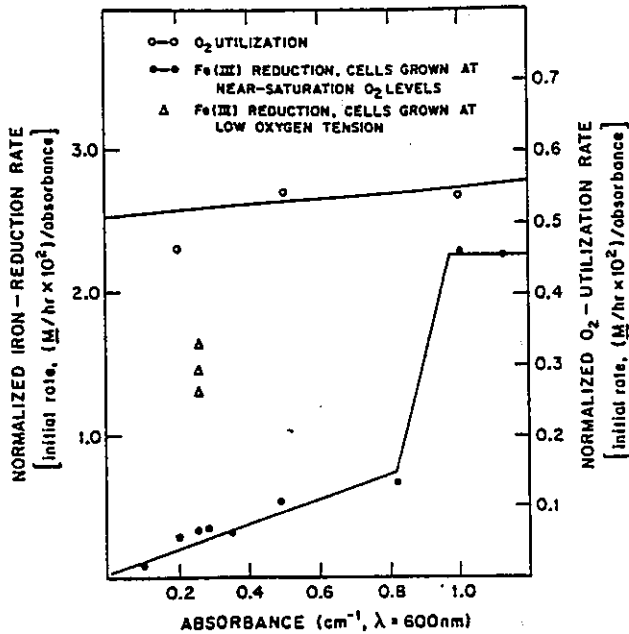


FIG. 1. Uninhibited O₂ utilization and iron reduction rates normalized on the basis of culture optical density at 600 nm.

図3.3-17

酸素濃度が鉄還元にはぼす影響

△ : 低酸素

● : 飽和に近い酸素

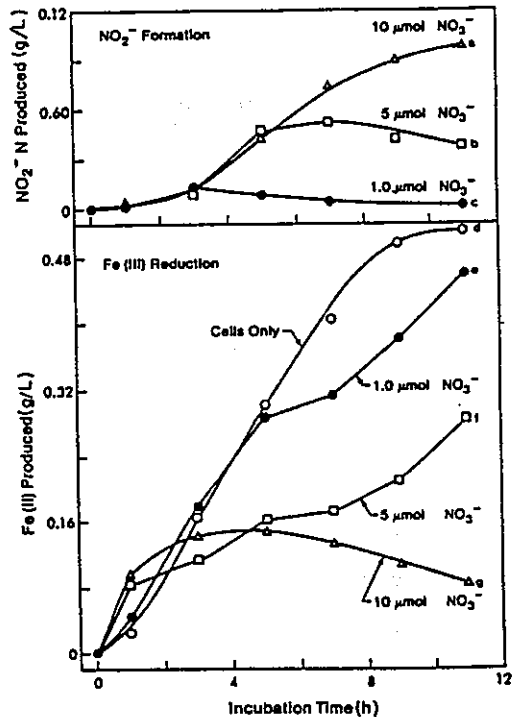


FIG. 1. Fe(III) reduction and NO₂⁻ formation in the presence of various concentrations of NO₃⁻.

図3.3-18

NO₃⁻が鉄還元にはぼす影響

表3.3-12 鉄還元細菌用培地の例³⁷⁾
(Pseudomonas用培地)

K ₂ HPO ₄	0.5 g/L
Na ₂ SO ₄	2.0 g/L
NH ₄ Cl	1.0 g/L
CaCl ₂	0.15 g/L
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.1 g/L
イーストエキス	0.5 g/L
60% Na lactate	3 mL/L
FeCl ₃	72 μM
ガス相	variable

表3.3-13 鉄還元細菌用培地の例³⁸⁾
(Alteromonas用培地)

NaHCO ₃	2.5 g/L
KCl	0.1 g/L
NH ₄ Cl	1.5 g/L
NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O	0.6 g/L
L-arginine hydrochloride	0.02g/L
L-glutamine	0.02g/L
DL-serine	0.04g/L
Fe(III) oxide	200 mmol Fe/L
または	
Fe citrate	50 mmol Fe/L
乳酸または蟻酸	variable
ガス相 N ₂ :CO ₂	(80:20)

表3.3-14 鉄還元細菌用培地の例³¹⁾
(GS-15に使用)

NaHCO ₃	2.5 g/L
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0.1 g/L
KCl	0.1 g/L
NH ₄ Cl	1.5 g/L
NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O	0.6 g/L
NaCl	0.1 g/L
MgCl ₂ ·6H ₂ O	0.1 g/L
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.1 g/L
MnCl ₂ ·4H ₂ O	0.005 g/L
NaMoO ₄ ·2H ₂ O	0.001 g/L
CH ₃ COONa	2.7 g/L
イーストエキス	0.05g/L
Fe(III) oxide	250 mmol Fe/L
ガス相 N ₂ :CO ₂	(80:20)

表3.3-15 鉄還元細菌用培地の例³⁹⁾
(Clostridium, Bacillus用培地)

グルコース	20 g
Na acetate	5.0 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.05 g
K ₂ HPO ₄	0.25 g
KH ₂ PO ₄	0.25 g
NaCl	0.05 g
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.005g
CaCO ₃	5.0 g
Fe ₂ O ₃ (ヘマタイト)	1.0 g
biotine	0.01 mg
thiamine	0.01 mg
p-aminobenzoic acid	0.01 mg
蒸留水	1000 mL

3.3.4 鉄酸化細菌

(1) 概要

鉄酸化細菌（または鉄細菌とも言う）とは、「二価鉄イオンを分子状酸素により三価鉄イオンに酸化し、そのエネルギーを利用して炭酸固定を行う化学合成独立栄養細菌」といわれている⁴¹⁾。しかし、後述のような問題があって、鉄酸化細菌の範囲は必ずしも明確ではない。

(2) 種類および基質利用性の調査

鉄酸化細菌研究の歴史を見てみると、まず、湿潤土壌の排水管などでの鉄の沈積が見られるとき、微生物も同時に観察されること⁴²⁾から、これらの鉄沈積物(deposit)の形成に微生物が関与している可能性が検討されてきた。(微生物としては、Gallionella, Leptothrix, Thiothrix, Thiobacillus, Crenothrix, Cladothrixが挙げられている⁴³⁾。)これらが化学的酸化であるのか、微生物による酸化、特に鉄を利用した独立栄養的増殖によるのかは、20世紀初頭から論争的であった^{44) 45)}。pH中性ないしアルカリ性の水でFe(II)が非生物的に酸化されることが、微生物の影響の判定を困難にしている⁴⁶⁾。

一方、米国の酸性の鉱山でFe(II)の酸化が起きていることがColmerとHinkleにより示され、そこから反応に関与すると思われる微生物が単離された⁴⁵⁾。Templeらは、この微生物は独立栄養的に鉄を利用することを示した⁴⁶⁾。

以上のように、半ば実用的な動機により鉄酸化細菌の研究が行われてきたが、そこで登場した微生物を表3.3-16にリストアップした。このうち、SphaerotilusとLeptothrixはもともと従属栄養的に増殖でき鉄酸化によるエネルギー獲得を併用している可能性が考えられてきた。しかし、新しい細胞の鉄の沈積量が少ないことなどから、おそらくFe(II)の酸化によるエネルギー獲得はできないであろうという推定がある⁴²⁾。この2種は鉄細菌というべきでないという意見⁴²⁾がある一方、新たに、鉄を沈積する細菌(iron depositors)という呼び名も登場した⁴⁶⁾。我が国では、笠原らが、鉄細菌と鉄酸化細菌の意味を区別して使っている⁴⁷⁾が、これはこの問題への対応を意図したものかもしれない。

SphaerotilusとLeptothrixは広い範囲の有機基質を利用する。それには、グルコースなどの糖類、メタノールなどのアルコール類、酢酸などの有機酸類が含まれる⁴²⁾。

次に、Gallionellaは酸素濃度を低くして非生物的なFe(II)の酸化を抑えて鉄を利用した独立栄養的増殖を確認できた^{42) 48)}。Thiobacillus ferrooxidansは、前述の酸性の鉱山で

のFe(II)の酸化に関与する。これが働くpH3以下⁴²⁾あるいはpH 2-4¹⁹⁾では非生物学的なFe(II)の酸化はほとんど起こらないので、独立栄養的増殖を確認できた⁴⁶⁾。Sulfolobusも至適pHが低く、非生物学的反応に影響されず鉄酸化を確認できた⁴⁹⁾。これらの3種は鉄酸化細菌と称して問題無いと考える。

(3) pHなど環境条件に対する生息範囲の調査

SphaerotilusとLeptothrixはpH範囲は6.5-8.1で活発に増殖し、特に7.5が最適とされている⁴²⁾。Gallionellaは3.3-7.5のpH範囲のうちでpH6.3-6.6において最も活発に増殖した⁴⁸⁾。Thiobacillus ferrooxidansに対するpHの影響調査の例を図3.3-19⁵⁰⁾に示す。一般には至適pHは2-4といわれる¹⁹⁾。Sulfolobusの至適pHは2.0である⁴⁹⁾。

SphaerotilusとLeptothrixが増殖する温度範囲は15~40℃、至適温度は30℃である⁴²⁾。Gallionellaは25℃で培養された⁴⁸⁾。Thiobacillus ferrooxidansは37℃で培養された⁵⁰⁾。Sulfolobusの至適温度は70℃である⁴⁹⁾。

酸素濃度の低下は、Sphaerotilusのように鞘を持ち溶解(lysis)しにくい細菌には有利と考えられる⁴²⁾。Gallionellaは微好気性⁴²⁾で低酸素濃度で増殖する。

Thiobacillus ferrooxidansやSulfolobusは前述のとおり鉄還元能を持つ場合がある²⁹⁾。

(4) 培地など培養方法の調査

鉄酸化細菌の培養に用いられた培地の例を表3.3-17⁵¹⁾、表3.3-18⁴⁸⁾、表3.3-19¹⁹⁾、表3.3-20⁴⁹⁾に示す。pHの低い後二者では、固形培地にする場合シリカゲルの平板などにする工夫が必要である。Thiobacillus ferrooxidansにおける培養は、文献¹⁹⁾では固形培地で30℃で約2週間、液体培養で30℃で約7日間とされている。

(5) 増殖・活性検出方法の調査

文献では、増殖をタンパク量⁵¹⁾で測定している例もあるが、Fe²⁺、Fe³⁺の経時変化で活性を調べている場合が多い。その一例を図3.3-20に示す。

表3.3-16 鉄酸化細菌として報告された微生物の種類と特徴

属名	特徴	鉄による独立栄養増殖
<u>Sphaerotilus</u>	鞘を持つ糸状細菌で、鞘に鉄を沈積する。	未確認
<u>Leptothrix</u>	同上	未確認
<u>Gallionella</u>	微好気性	確認
<u>Thiobacillus</u> (<u>T. ferrooxidans</u>)	硫黄酸化細菌。	確認
<u>Sulfolobus</u>	硫黄酸化細菌。好熱性。古細菌。	確認

図3.3-19

pHが鉄酸化に
及ぼす影響
(Thiobacillus
ferrooxidans)

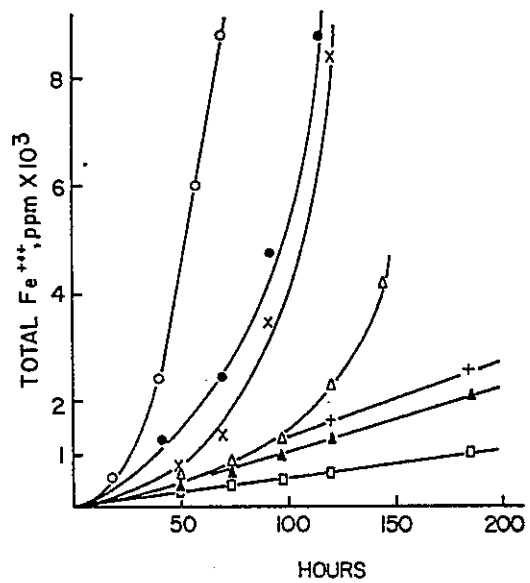


FIG. 1. Influence of pH and phosphate on the oxidation of ferrous iron by *Thiobacillus ferrooxidans*. "Total iron" includes dissolved and suspended iron. Conditions: ○ = pH 2.5, 1 × KH₂PO₄ (= 500 ppm; 3.67 × 10⁻³ M); × = pH 1.8, 1 × KH₂PO₄; △ = pH 1.4, 1 × KH₂PO₄; ▲ = pH 1.2, 1 × KH₂PO₄; + = 2.5, 2 × KH₂PO₄; ● = pH 1.8, 2 × KH₂PO₄; □ = pH 2.5, 1 × KH₂PO₄, uninoculated.

表3.3-17 鉄酸化細菌用培地の例⁵¹⁾
(Sphaerotilus用)

ペプトン	0.15 %
イーストエキス	0.10 %
HEPES	10 mM
クエン酸アンモニウム	0.028 %
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.02 %
CaCl ₂	0.005 %

表3.3-18 鉄酸化細菌用培地の例⁴⁸⁾
(Gallionella用)

NH ₄ Cl	0.1 %
K ₂ HPO ₄	0.05 %
MgSO ₄	0.02 %
FeS上澄液	variable

表3.3-19 鉄酸化細菌用培地の例¹⁹⁾
(Thiobacillus ferrooxidans用)

(NH ₄) ₂ SO ₄	3.0 g
KCl	0.1 g
K ₂ HPO ₄	0.5 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.5 g
Ca(NO ₃) ₂	0.01 g
脱イオン水	1000 mL
(pH	3~4)
FeSO ₄ ·7H ₂ O	2 %

表3.3-20 鉄酸化細菌用培地の例⁴⁹⁾
(Sulfolobus用)

KCl	0.2 g
K ₂ HPO ₄	0.2 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	0.4 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.4 g
Na ₂ MoO ₄	0.0003 g
イーストエキス	0.2 g
脱イオン水	1000 mL
(pH	2.0)

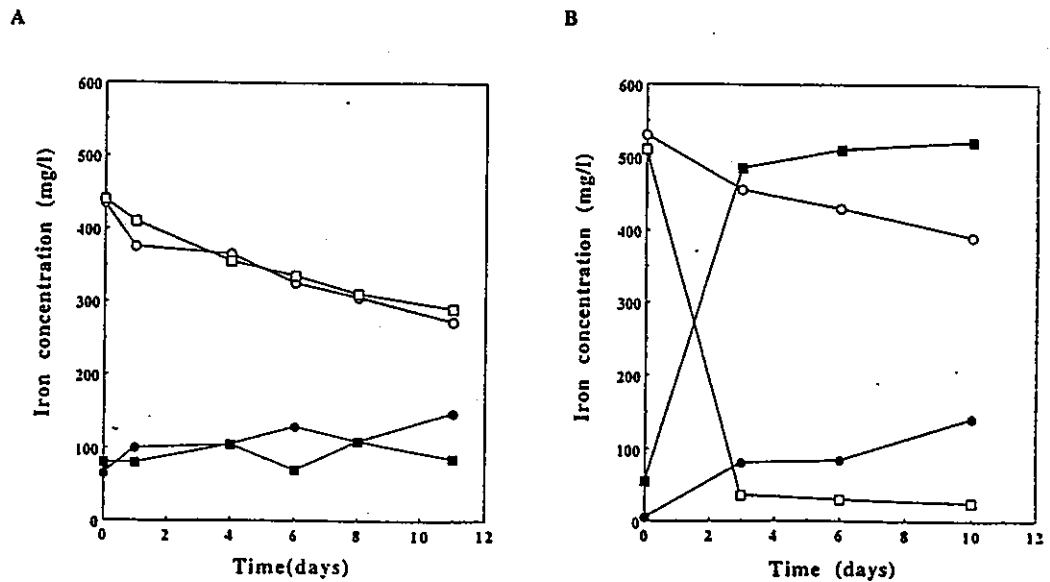


Fig. 1. Ferrous Iron Oxidizing Ability of *S. acidocaldarius*.

(A) strain 7. (B) strain ATCC 33909. Microbes were incubated with 9 mM ferrous sulfate in Medium III at 70°C. Symbols: □, inoculated (Fe²⁺); ○, uninoculated (Fe²⁺); ■, inoculated (Fe³⁺); ●, uninoculated (Fe³⁺).

図3.3-20 鉄酸化細菌接種のときのFe(II)減少とFe(III)増加の測定例

3.3.5 耐性領域図作成への見通し

これまでの研究で、pHおよびEhを制御できる培養装置（ファーマンタと称している）を用いて、硫酸塩還元細菌（SRB）、メタン生成細菌（MPB）、および硫黄酸化細菌（SOB）に属する純粋培養微生物の耐性領域図作成方法を開発してきた。ファーマンタにおいてpHは、pH電極による測定とNaOHまたはHCl注入により、EhはORP電極による測定とキャリアガス組成変化（ORPを上げたいとき酸素を混入するなど）により制御してきた。しかし、培地組成などは選定した微生物によって異なる上、微生物の増殖・活性検出手法（増殖の測定のためには細菌の数を測定し、活性の測定のためには基質の消費量や生成物を測定する）は微生物ごとに大幅に変えてきた。即ち、SRBの場合、強力な還元剤である硫化水素が原則として使えずSRBの増殖を待つて所定のEhまで下がってから試験を行ったので、精度良い増殖の検出ができず、活性のみ検出することとなった。活性は、pHがあまり高くない条件ではキャリアガス流出部の H_2S で、pHが高い条件（ $\text{pH} > 10$ ）では溶解する H_2S による FeS 生成で検出した。MPBは、SRBと別の面から増殖の測定がしにくかった（増殖速度が低い）ので、やはり活性測定のみとなった。活性はキャリアガス流出部の CH_4 で測定した。SOBは、増殖速度は比較的速いが、簡単に活性を測定できないので、濁度により増殖を測定した。なお、微生物の増殖と活性は通常は連動している。

こういう観点から、脱窒細菌、鉄還元細菌、および鉄酸化細菌の耐性領域図作成を見通してみると、表3.3-21のようになる。脱窒細菌の場合、一般には培養が容易であるが脱窒していることを確認するためには確実な密閉系でガスの N_2 （あるいはアセチレン阻害法でガスの N_2O ）の測定をするか、 ^{15}N 法を用いる必要がある。しかし、その場合キャリアガスを流しながらの実験は困難でありEhの制御は別の方法による必要がある。脱窒確認せず NO_3^- 還元のみ確認するのであれば、キャリアガスを用いてEh制御が可能である。従って、表3.3-21には二通りの方法を記した。

鉄還元細菌は、海外ではこの10年来研究が活発化してきたが、わが国では約30年ほど前の土壤での論文以外ほとんど研究がされていない細菌である。耐性領域図以前に、菌株が入手できるか、培養ができるかどうかの検討が必要と思われるが、表3.3-21には一応方法を記した。 Fe^{2+} の生成と細胞数の両方の確認が必要と考えられる。 $\text{Fe}(\text{III})$ が妨害するので濁度による増殖測定は困難である。

鉄酸化細菌は、二つのグループに分けられる。 Fe^{2+} の減少、 Fe^{3+} や鉄沈積物の増加で活性を見るのが普通であるが、 $\text{pH} > 4$ の場合には化学的な $\text{Fe}(\text{II})$ の酸化もあるので微生物の活

性を確認するには別法の併用が必要である。Fe(III)が妨害するので濁度による増殖測定は困難である。

耐性領域図で特定微生物のpHとEhに対する増殖・活性の生理学的特性を把握するには、純粋培養微生物を用いる必要がある。しかし、目的とする微生物の純粋培養が容易に入手できそうも無い場合、何らかの対策が必要である。一つは、時間はかかってもその微生物を探索、単離する方法、もう一つはそういう微生物を含むと思われる自然の微生物群で活性のみ測定する方法（増殖測定は困難）である。前者は研究に長期間を要し、後者ではデータの生理学的意味が薄れる。

表3.3-21 純粋培養微生物の耐性領域図作成方法の実施例と方案例

微生物グループ	pH制御	ORP制御	増殖検出	活性検出
S R B (pH ≤ 10)	薬注	ガス組成変化		排気ガスH ₂ S測定
S R B (pH > 10)	薬注	ガス組成変化		FeS黒変
M P B	薬注	ガス組成変化		排気ガスCH ₄
S O B	薬注	ガス組成変化	濁度	
脱窒細菌	薬注	ガス組成変化	濁度など	NO ₃ -減少
		薬注	濁度など	ガスN ₂ O (排気しない)
鉄還元細菌	薬注	ガス組成変化	細胞数(顕微鏡)	Fe ²⁺
鉄酸化細菌(pH < 4)	薬注	ガス組成変化		Fe ²⁺ 、Fe ³⁺
鉄酸化細菌(pH > 4)	薬注	ガス組成変化	細胞数(顕微鏡)	Fe ²⁺ 、鉄沈積物

3.4 圧密ベントナイト中への微生物の移行に関する実験方法・予察試験

3.4.1 実験・測定方式の検討

ベントナイト粉体については紫外線の照射と2度の70℃の加熱により微生物群を大幅に殺菌する事ができて、基本的には投与菌のみを計測することが可能になった。しかしカビ、孢子菌などはこの条件でも残存する可能性があり、また圧密ベントナイトの成型時に雑菌が混入する恐れがあり、この防御の為に投与する供試菌を抗生物質（アンピシリン）耐性菌にして雑菌の生育を抑えて計測の信頼性を更に高める方法を用いた。

圧密ベントナイトへの微生物の透過試験開始後、液面先端は18日前後で成型体の底部に達した。この際指示薬による浸透位置の検定法（特にエオシンによる赤色）が透過部位を鮮明させることができた。また試験容器に試験体を設置する際のベントナイト損傷、不具合に対する判断材料の一つになった（写真3.4-1）。

培養液投与による試験体の膨潤については焼成アルミナを濾過材料及び支持体に用いる方式は十分に機能を果たす事ができた。菌の投与方法の検討結果は培養液を35℃で投与するよりも28℃で、また増殖期の菌を投与前の直前に新しい培地で倍に希釈して、緩やかに増殖させながら適当量の新鮮な培養菌を4日ごとに供給する事で菌を長時間生存させる事ができた。しかしこの方法は培養菌の交換時の雑菌の機会や低温でのカビの生育を助長する事にもなるので細心の注意が必要になった。

ベントナイト中の透過菌の測定法の検討結果では、先ず試験終了時の試験体の容器からの無菌的な抜き出しに際して容器と同じ径のシリコン栓をあてがって上面方向から押し出す事で操作上での雑菌の汚染を防ぎ得る事が分かった。また試験体の切り出しは菌の透過の少ないと考えられる底部より行うことが好ましい結果となった。

菌数の測定は切り出し切片、0.2gを生理的食塩水で懸濁させ、10倍液の希釈法でコロニーを計測させる事ができた。ただし希尺度の低い時にはベントナイト粒子が菌のコロニーと区別されにくく成る（特にLB培地）がコロニーの増大を経時的に追跡する事で区別させた。また前記のように50ppmのアンピシリンとBTB（24ppm）を加えた寒天培地の選択が比較的良好であった。しかし実際の計測には試験体によっては尚かつカビなど糸状菌の混入、繁殖が見られる場合があった。

ベントナイト試験体の薄切り切片を寒天培地上で直接培養する方法では寒天中で切片が更に膨潤が進んで寒天に亀裂を生じさせまた菌を増殖させてコロニーを作らせる事が困難であった（写真3.4-2）。

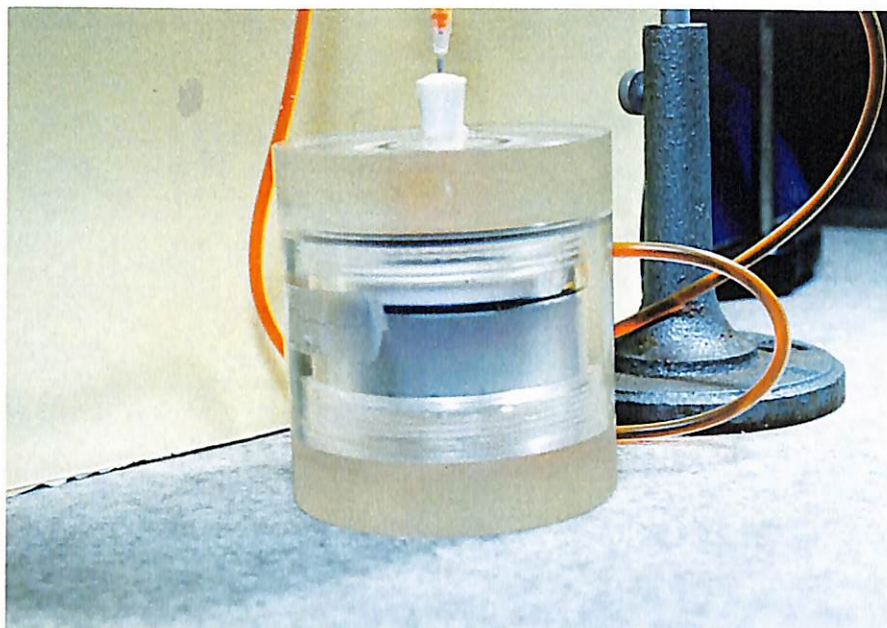


写真3. 4-1 培養液投与中の圧密ベントナイト試験検体の状況



写真3. 4-2 薄切り切片の寒天培地上での直接培養方法の状況

3.4.2 圧密ベントナイト中の微生物の移行の予察試験

菌が長く生存するように増殖期の大腸菌培養液（ 10^5 個/ml）を使って28℃の恒温室中で上面より滴下させて菌の透過・移行の有無を試みた。大腸菌の培養液はEMBまたはLB培地、pH 7.2を用いた。投与日数の違う数度の予察試験において乾燥状態の圧密ベントナイト中へ微生物が移行する可能性を必ずしも確実に否定できない結果を示唆するようなデータも得られている。その代表例を表3.4-1と写真3.4-3に示す。

なお検体はベントナイト、0.2gで100倍希釈による測定が比較的良いことでその結果を示した。即ち、本測定法においてもある場合には雑菌の混入による計数の精度の乱れはあったが上層部から底部（I～VI）に向けての菌数の推移傾向と中層部で菌数が多い現象などが見られる事からも上記の可能性を判定した。前述のように投与菌以外のカビが検知される場合も見受けられた（写真3.4-4）。これらは菌数から除いて測定した。

表3.4-1 圧密ベントナイト検体の各層における菌数測定結果例

ベントナイト検体(0.2g)中の菌数($\times 10^2$)				
試験No.		1 (15日投与)	3 (28日投与)	
寒天培地		一般性菌数用	一般性菌数用	LB
ベ ン ト ナ イ ト 層	底部 I	0	0	0
	II	—	—	70
	III	9	121	43
	IV	—	1670	922
	V	30	2404	2200
	最上部 VI	5910	3306	2290

—：測定データなし。

またベントナイト検体の残りの半分を保存して微生物群の繁殖の目視により観察を行った結果、糸状菌類に限られるがおおよそ1.5cm程度の深さ（I～III）にコロニーの形成が認められることがあった（写真3.4-5）。これはこの菌類が孢子の形でベントナイトに侵入する可能性を示しているものと思われる。

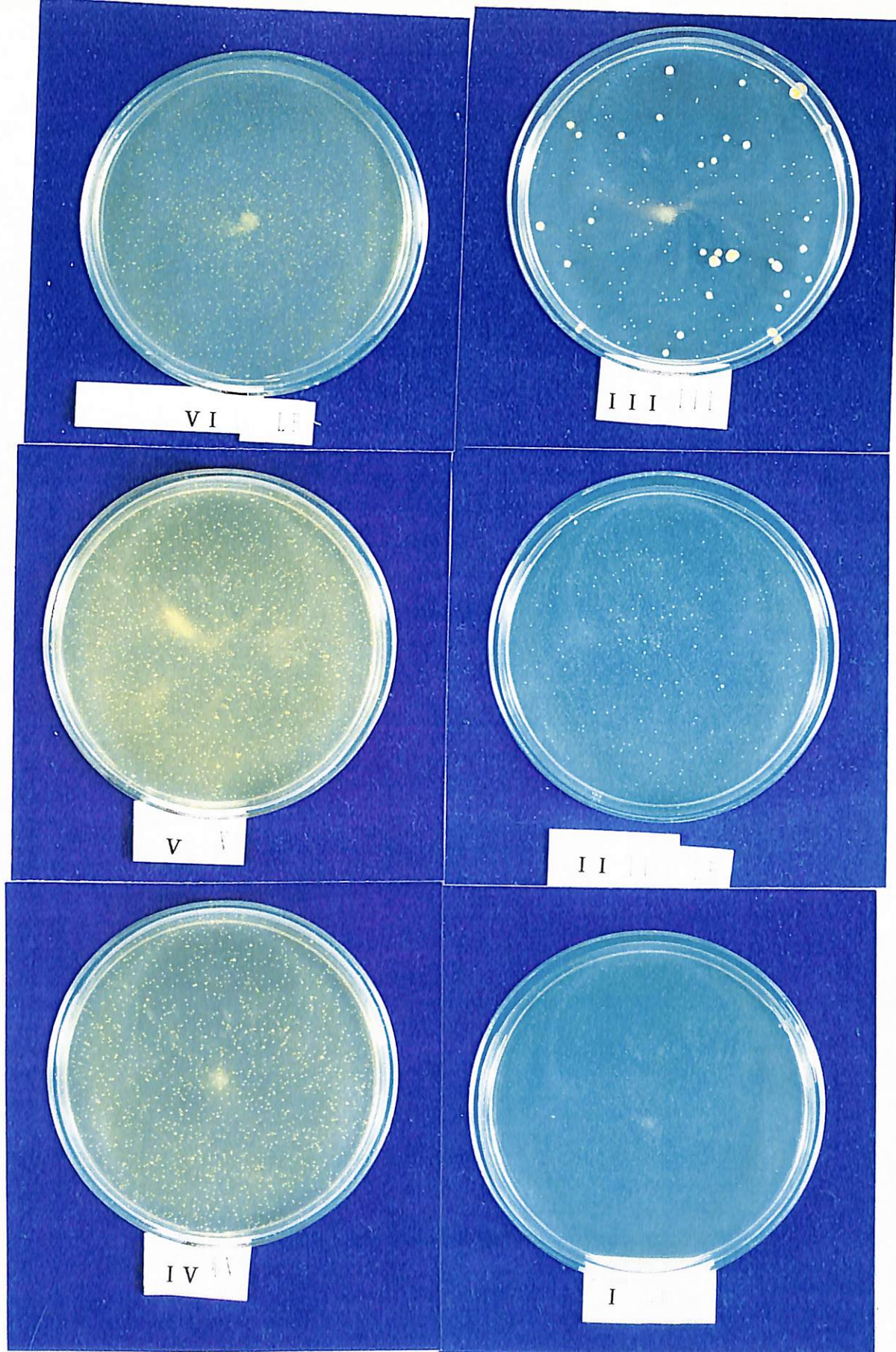


写真3. 4-3 圧密ベントナイト検体の各層における菌数



写真3. 4-4 菌数測定サンプルにおける投与菌以外のカビの検知例
上層部

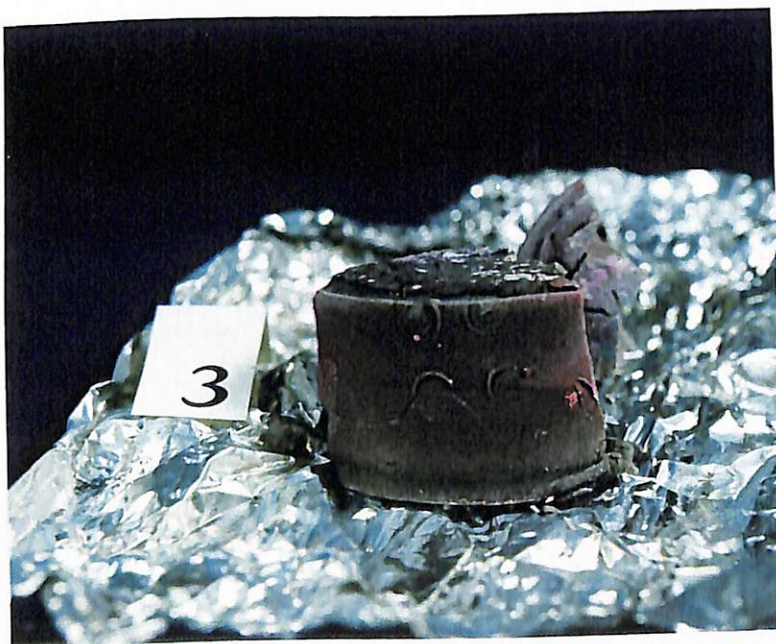


写真3. 4-5 保存したベントナイト検体の微生物群の繁殖
1-2週間後

以上予察試験では乾燥状態の試験検体取り出しはもしかすると菌類が侵入する可能性を否定できず、本試験において、更に測定法の改良を加えて、確認を行う必要性があらうと思われる。以下に今回得られた検討での測定操作上などの留意点と今後の取組課題を列記する。

- (1) ベントナイト成型時の殺菌と取扱い注意： 成型体の作成、抜き出しにも雑菌の混入を極力防ぐために消毒用アルコールで成型機を消毒した。また成型体を成型機から手を振れずに完全に抜くために途中で欠けるものがある(50%)。

例えば出来上がった成型体の加熱などによる殺菌処理が必要かと考えられる。

- (2) 成型体の容器収納と培養液滴下時のトラブル： 容器に収納時に無菌的に上面よりリング、アルミナフィルターを挟んでネジ込みで密閉するが、この際成型体が崩れやすい。逆にネジ込みが甘いと培養液の滴下初期に成型体の側面から液漏れを生じる。これには液中の指示薬が判断に役立った。また密閉し過ぎて上面への液の逆流、菌の生育状態の管理も必要である。細かに適量の新鮮な培養菌を与える。

またアクリル製容器であるが出来るだけ蒸気滅菌も行う必要があらう。

- (3) 終了時試験体の抜きだし： 容器のネジ込み蓋が堅くなり回しにくくなる。容器を万力で固定し易く切断した。また試験体を押し出すために同じ径のシリコン栓を滅菌して上面から一方向に押し出すようにする。

- (4) 試験体の切りだしと菌計測： 作業は滅菌カッター、先端シリコン付きコルクボーラーを用意して深さごとに一定量切りだしてこれをホモジナイザーにて均一に懸濁させる。塊があると寒天培地でコロニーを数える際に誤りを生じる恐れがある。菌数の計測には試験前にベントナイト中に残存する菌種と区別するため抗生物質耐性の菌を滴下菌に選んだ。しかし抗生物質添加寒天培地の菌数計測においてまま混入菌が認められるようである。今回の投与菌液はベントナイトと抗生物質の結合により層中の濃度が高くなり、透過した菌が死滅することを避けて、抗生物質を添加しなかったが、添加した菌液を用いる事で少しでも雑菌を少なくする試みもよからう。

- (5) 更には乾燥検体の他に予め吸水させたり、緩衝液でベントナイトを中性にしたりして透過試験を追加や確認をすることが必要である。また孢子菌の透過の可能性もあるのでこれも確認する事を提案したい。

参考文献

- 1) Postgate J.R., The sulphate reducing bacteria, p130, Cambridge Univ. Press London, NY (1981)
- 2) 高山 正彦ら、銀及び銅イオンの抗菌性 : J. Antibact. Antifung. Agents, vol.22, pp. 531-536 (1994).
- 3) 伊崎 和夫、微生物と重金属イオン—特に重金属耐性を中心に— : 生化学、vol.45, pp.219-233 (1973)
- 4) Thurman R.B., C.P. Gerba, The molecular mechanisms of copper and silver ion disinfection of bacteria and viruses : CRC Critical Rev. in Environmental Control. 18, pp.295-315 (1989).
- 5) Knowles, R., Denitrification : Microbiological Reviews, Vol.46, pp.43-70 (1982)
- 6) Gamble, T.N. et al., Numerically dominant denitrifying bacteria from world soils : Appl. Environ. Microbiol., Vol.33, pp.926-939 (1977)
- 7) Sperl, G.T., Denitrification with methanol: a selective enrichment for Hyphomicrobium species : J. Bacteriol., Vol.108, No.2, pp.733-736 (1971)
- 8) Sawhney, V. and Nicholas, D.J.D., Sulphite- and NADH-dependent nitrate reductase from Thiobacillus denitrificans : J. gen. Microbiol., Vol.100, pp.49-58(1977)
- 9) Evans, W.C., Biochemistry of the bacterial catabolism of aromatic compounds in anaerobic environments : Nature, Vol.270, No.3, pp.17-22 (1977)

- 10) Brown, L.R. and Darnell, T.R., Factors affecting the microbial deterioration of asphalt overlays : PB report, 86-185709, NTIS. USA. (1986)
- 11) Koskinen, W.C. and Keeney D.R., Effect of pH on the rate of gaseous products of denitrification in a silt loam soil : Soil. Sci. Soc. Am. J., Vol.46, pp.1165-1167 (1982)
- 12) van Kleemput O. and Patrick W.H.Jr., Nitrate and nitrite reduction in flooded gamma-irradiated soil under controlled pH and redox potential conditions : Soil. Biol. Biochem., Vol.6, pp.85-88 (1974)
- 13) Gilliam, J.W. and Gambrell, R.P., Temperature and pH limiting factors in loss of nitrate from saturated atlantic coastal plain soils : J. Environ. Qual., Vol.7, No.4, pp.526-532 (1978)
- 14) Timmermans, P and van Haute, A., Denitrification with methanol : Water Res., Vol.17, No.10, pp.1249-1255 (1983)
- 15) Prakasam, T.B.S. and Loehr, R.C., Microbial nitrification and denitrification in concentrated wastes : Water Res., Vol.6, pp.859-869 (1972)
- 16) Keeney D.R. et al., Effect of temperature on the gaseous nitrogen products of denitrification in a silt loam soil : Soil Sci. Soc. Am. J., Vol.43, pp.1124-1128 (1979)
- 17) Hochstein, L.I. et al., The effect of oxygen on denitrification during steady-state growth of *Paracoccus halodenitrificans* : Arch. Microbiol., Vol.137, pp.74-78 (1984)

- 18) Oltmann, L.F. et al., Characterization of purified nitrate reductase A and chlorate reductase C from *Protreus mirabilis* : Arch. Microbiol., Vol.111, pp. 25-35 (1976)
- 19) 土壤微生物研究会, 新編土壤微生物実験法 : 養賢堂, (1992)
- 20) Vangnai, S. and Klein, D.A., A study of nitrite-dependent dissimilatory micro-organisms isolated from Oregon soils : Soil Biol. Biochem., Vol.6, pp. 335-339 (1974)
- 21) Focht, D.D. et al., Use of interfaced gas chromatography-mass spectrometry for detection of concurrent mineralization and denitrification in soil : J. Environ. Qual., Vol.9, No.2 pp.218-223 (1980)
- 22) Yoshinari, T. et al., Acetylene inhibition of nitrous oxide reduction and measurement of denitrification and nitrogen fixation in soil : Soil Biol. Biochem., Vol.9, pp.177-183 (1976)
- 23) Klemetsson, B.H. et al., The use of acetylene inhibition of nitrous oxide reductase in quantifying denitrification : Swedish J. Agric. Res., Vol.7 pp.179-185 (1977)
- 24) Sorensen, J., Denitrification rates in a marine sediment as measured by the acetylene inhibition technique : Appl. Environ. Microbiol., Vol.36, No.1, pp.139-143 (1978)
- 25) Parkin, T.B. et al., Comparison of field denitrification rates determined by acetylene-based soil core and nitrogen-15 methods : Soil. Sci. Soc. Am. J., Vol.49, pp.94-99 (1985)

- 26) Kanner, D. and Bartha, R., Growth of *Nocardia rhodochrous* on acetylene gas :
J. Bacteriol., Vol.139, No.1, pp.225-230 (1979)
- 27) IHI社内データ
- 28) Painter, H.A., A review of inorganic nitrogen metabolism in microorganisms :
Water Res., Vol.4, pp.393-450 (1970)
- 29) Lovley, D.R., Dissimilatory Fe(III) and Mn(IV) reduction : Microbiological
Reviews, Vol.55, No.2, pp.259-287 (1991)
- 30) Lovley, D.R. et al., Fe(III)-reducing bacteria in deeply buried sediments of
the Atlantic Coastal Plain : Geology, Vol.18, pp.954-957 (1990)
- 31) Lovley, D.R. and Phillips, E.J.P., Novel mode of microbial energy metabolism
: organic carbon oxidation coupled to dissimilatory reduction of iron or
manganese : Appl. Environ. Microbiol., Vol.54, No.6, pp.1472-1480 (1988)
- 32) Lovley, D.R. et al., Enzymatic versus nonenzymatic mechanisms for Fe(III)
reduction in aquatic sediments : Environ. Sci. Technol., Vol.25, pp.1062-
1067 (1991)
- 33) Lovley, D.R. et al., Hydrogen and formate oxidation coupled to dissimilatory
reduction of iron or manganese by *Alteromonas putrefaciens* : Appl. Environ.
Microbiol., Vol.55, No.3, pp.700-706 (1989)
- 34) de Castro, A.F. and Ehrlich, H.L., Reduction of iron oxide minerals by a
marine *Bacillus* : Antonie van Leeuwenhoek, Vol.36, pp.317-327 (1970)

- 35) Brock, T.D. and Gustafson, J., Ferric iron reduction by sulfur- and iron-oxidizing bacteria : Appl. Environ. Microbiol., Vol.32, No.4, pp.567-571 (1976)
- 36) Jones, J.G. et al., Bacterial reduction of ferric iron in a stratified eutrophic lake : J. gen. Microbiol., Vol.129, pp.131-139 (1983)
- 37) Arnold, R.G. et al., inhibitor studies of dissimilative Fe(III) reduction by Pseudomonas sp. strain 200 : Appl. Environ. Microbiol., Vol.52, No.2, pp.281-289 (1986)
- 38) Obekwe, C.O. and Westlake, W.S., Effect of nitrate on reduction of ferric iron by a bacterium isolated from crude oil : Can. J. Microbiol., Vol.27, pp.692-697 (1981)
- 39) Hammann, R. and Ottow, J.C.G., Reductive dissolution of Fe₂O₃ by Saccharolytic Clostridia and Bacillus polymyxa under anaerobic conditions : Z. Pflanzenernaehr. Bodenkd., Vol.137, pp.108-115 (1974)
- 40) Stookey, L.L., Ferrozine-a new spectrophotometric reagent for iron : Analytical Chemistry, Vol.42, No.7, pp.779-781 (1970)
- 41) 山田常雄ほか, 岩波生物学辞典 : 第3版, 岩波書店 (1983)
- 42) van Veen, W.L. et al., The Sphaerotilus-Leptothrix group of bacteria : Microbiological Reviews, Vol.42, No.2, pp.329-356 (1978)
- 43) Spencer, W.F. et al., The occurrence and cause of iron oxide deposits in tile drains : Soil Science Society Proceedings, pp.134-137 (1963)

- 44) Glathe, H. and Ottow, J.C.G., Ecological and physiological aspects of the mechanism of iron oxidation and ochreous deposit formation - A review : Zbl. Bakt. Abt. II Vol. 127, pp.749-769 (1972)
- 45) Temple, K.L. and Colmer, A.R., The autotrophic oxidation of iron by a new bacterium : *Thiobacillus ferrooxidans* : J. Bacteriol., Vol.62, pp.605-611 (1951)
- 46) Jones, J.G., A note on the isolation and enumeration of bacteria which deposit and reduce ferric iron : J. Appl. Bacteriol., Vol.54, pp.305-310 (1983)
- 47) 笠原晃明ほか, 球状黒鉛鑄鉄埋設管の黒鉛化腐食におけるバクテリアの役割 : 材料と環境, Vol.40, No.12, pp.806-813 (1991)
- 48) Kucera, S. and Wolfe, R.S., A selective enrichment method for *Gallionella ferruginea* : J. Bacteriol., Vol.74, pp.344-349 (1957)
- 49) Tobita, M. et al., Pyrite oxidation by *Sulfolobus acidocaldarius* : Biosci. Biotech. Biochem., Vol.58, No.4, pp.771-772 (1994)
- 50) Razzell, W.E. and Trussell, P.C., isolation and properties of an iron-oxidizing *Thioacillus* : J. Bacteriol., Vol.85, pp.595-603 (1963)
- 51) Rogers, S.R. and Anderson, J.J., Measurement of growth and iron deposition in *Sphaerotilus discophorus* : J. Bacteriol., Vol.126, No.1, pp.257-263 (1976)