

# 耐塩性鉄酸化細菌の馴養による電気メッキ排水処理の検討

著者	三木 理, 加藤 敏朗, 伊藤 公夫, 実原 幾雄
著者別表示	Miki Osamu, Kato Toshiaki, Ito Kimio, Jitsuhara Ikuo
雑誌名	水環境学会誌
巻	30
号	3
ページ	155-159
発行年	2007
URL	<a href="http://doi.org/10.24517/00064536">http://doi.org/10.24517/00064536</a>

doi: 10.2965/jswe.30.155



## 耐塩性鉄酸化細菌の馴養による電気メッキ排水処理の検討

三 木 理\*                    加 藤 敏 朗\*  
伊 藤 公 夫\*                実 原 幾 雄\*

### Electroplating Wastewater Treatment using Halotolerant Iron-oxidizing Bacteria Acclimated to Seawater

Osamu MIKI\*, Toshiaki KATO\*,  
Kimio ITO\* and Ikuo JITSUHARA\*

\* Advanced Technology Research Laboratories Technical Development Bureau, Nippon Steel Corp., 20-1 Shintomi, Futtsu, Chiba 293-8511, Japan

#### Abstract

The iron-oxidizing bacterium, *Thiobacillus ferrooxidans*, is not halotolerant and cannot oxidize ferrous ions ( $\text{Fe}^{2+}$ ) to ferric ions ( $\text{Fe}^{3+}$ ) in electroplating wastewater containing high concentrations of chlorine ions. *T. ferrooxidans* cannot be used for the treatment of such electroplating wastewater. The acclimation of iron-oxidizing halotolerant bacteria has been studied to treat electroplating wastewater containing ferrous ions and a high concentration of chlorine ions. Iron-oxidizing bacteria that are halotolerant and able to oxidize  $\text{Fe}^{2+}$  to  $\text{Fe}^{3+}$  were obtained from the activated sludge of a steel works coke-oven wastewater treatment plant. A long-term experiment using artificial wastewater containing  $20,000 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$  chlorine ions showed the stable performance of the  $\text{Fe}^{2+}$  oxidation ability by iron-oxidizing bacteria acclimated to seawater. It seems that the acclimated iron-oxidizing bacteria can be used for the treatment of electroplating wastewater. An analysis of genomic DNA extracted from the acclimated sludge of the reactor showed the existence of an analog of the iron-oxidizing bacterium, *Thiobacillus prosperus*.

**Key words:** electroplating wastewater, iron-oxidizing bacteria, halotolerance, *Thiobacillus prosperus*, *Thiobacillus ferrooxidans*

#### 1. はじめに

pHが2~3で活性の高い独立栄養の鉄酸化細菌として *Thiobacillus ferrooxidans* が広く知られており、鉱山排水処理やバイオリーチングの分野で広く適用例が報告されている<sup>1-5)</sup>。著者らは製鉄所の電気メッキ工場から発生する排水（以下、メッキ排水と述べる）を対象とし、鉄酸化細菌 *Thiobacillus ferrooxidans* を活性汚泥から馴養し、このスラッジを用いてメッキ排水中の2価鉄イオン ( $\text{Fe}^{2+}$ ) を酸化し、水酸化鉄(III)と他の金属成分に分離することにより、有価金属を回収するプロセスを検討してきた。これまでに、メッキ排水処理に鉄酸化細菌 *Thiobacillus ferrooxidans* を活用する方法は、ランニングコストが小さい利点があり、利用可能性は十分にあることを報告している<sup>6-10)</sup>。

しかし、開発の過程において、メッキ工場が硫酸ではなく塩酸を用いる場合には、メッキ工場排水に大量の塩素イオンが含まれ、このような排水の場合には *Thiobacillus ferrooxidans* が非好塩菌であるため、その適用がかなり困難となることを知見した<sup>11)</sup>。このようなメッキ排水処理の場合、耐塩性を有する鉄酸化細菌を用いる必要があると考えられる。以下、本稿では塩をNaClの同義語として用いる。

そこで、新たに耐塩性を有する鉄酸化細菌の取得を目指し、製鉄所の安水（コークス工場排水）活性汚泥処理設備から活性汚泥を採取し、高濃度の塩の存在下であっても、メッキ排水中の  $\text{Fe}^{2+}$  を  $\text{Fe}^{3+}$  に酸化できる鉄酸化細菌群の馴養を試みた。さらに、高濃度の塩を含む人工メッキ排水の長期処理実験を実施し、メッキ排水処理への適用の可能性を確認した。さらに、このような方法で増殖させた耐塩性のある鉄酸化細菌群への塩濃度の影響やPCR-DGGE法による群集構造解析を実施した。

#### 2. 実験方法

##### 2.1 耐塩性を有する鉄酸化細菌の馴養

耐塩性を有する鉄酸化細菌の馴養は、以下の手順で行った。

**Fig.1**に鉄酸化細菌の実験装置を示す。実験装置は、有効容量20l (285mm×220mm×有効深さ600mm)の反応槽と有効容量10l (内径:180mm;高さ:570mm)の汚泥沈降槽からなる。反応槽と汚泥沈降槽は一体形となっており返送汚泥は汚泥沈降槽下部の自然沈降管により反応槽に自動的に返送される。このため、返送汚泥量は測定していない。反応槽は、ORP(Oxidation Reduction Potential, 金/銀-塩化銀電極)センサー、pHセンサー、DOセンサーを備えている。まず、**Fig.1**の反応槽に採取した活性汚泥

\* 新日本製鐵(株)技術開発本部先端技術研究所 〒293-8511 千葉県富津市新富20-1

**Table 1** Comparison between acclimation conditions of iron-oxidizing bacteria for electroplating wastewater treatment

	Iron Salt	Solvent	Chlorine Ion Concentration
Experimental Condition	Ferrous Chloride	Diluted Seawater	3,000~15,000 mg·l <sup>-1</sup>
Reference Data <sup>10)</sup>	Ferrous Sulfate	Freshwater	20~40 mg·l <sup>-1</sup>

20lを投入した。その後、淡水で希釈した海水(Cl<sup>-</sup>濃度: 3,000 mg·l<sup>-1</sup>)に塩化第一鉄をFe<sup>2+</sup>濃度として100 mg·l<sup>-1</sup>, NH<sub>4</sub>-Nを2.5 mg·l<sup>-1</sup>(塩化アンモニウム), PO<sub>4</sub>-P(リン酸水素二カリウム)を0.5 mg·l<sup>-1</sup>含む人工排水を作成し、反応槽に供給した。馴養当初は反応槽のHRT(水理学的滞留時間: Hydraulic Retention Time)が、6時間となるように通水した。参考として*Thiobacillus ferrooxidans*を馴養した条件<sup>10)</sup>との比較をTable 1に示す。

反応槽のpHは、pH制御装置と接続した薬注ポンプにより、10%HClまたは10%NaOHを供給してpH=3目標で制御した。既報<sup>10)</sup>で述べたようにpHを3~4程度に制御することにより反応槽での水酸化第二鉄のスラリー化を進め、高効率処理が可能となる。また、ブロワにより、反応槽に5l·min<sup>-1</sup>の空気を供給するとともに、反応槽のORP値が+550mVより低下する場合、補助ブロワを稼働させた。補助ブロワの空気量は、5~10l·min<sup>-1</sup>とした。週に2~3度の頻度で人工排水および処理水のFe<sup>2+</sup>濃度を測定し、鉄酸化性能を確認しつつ、通水量を段階的に高めてHRTを2時間まで短縮した。また、海水の混合割合もHRTの短縮に連動して徐々に高め、塩素イオン濃度として15,000 mg·l<sup>-1</sup>まで増加させた。また、HRTが2時間の条件でFe<sup>2+</sup>の酸化処理が順調に推移していた時期の反応槽中の鉄スラッジを採取し、微生物解析に供した。

## 2.2 人工排水の連続処理

鉄酸化細菌の反応槽に、海水に塩化第一鉄を添加した人工排水(Fe<sup>2+</sup>: 100または500 mg·l<sup>-1</sup>; NH<sub>4</sub>-N: 5 mg·l<sup>-1</sup>; PO<sub>4</sub>-P: 1 mg·l<sup>-1</sup>; Cl<sup>-</sup>: 20,000 mg·l<sup>-1</sup>)を通水し、7ヶ月間の連続実験を実施した。反応槽のHRT(水理学的滞留時間: Hydraulic Retention Time)は、2時間となるよう

に通水し、その他の反応槽の運転条件は前述した保々にしたがった。

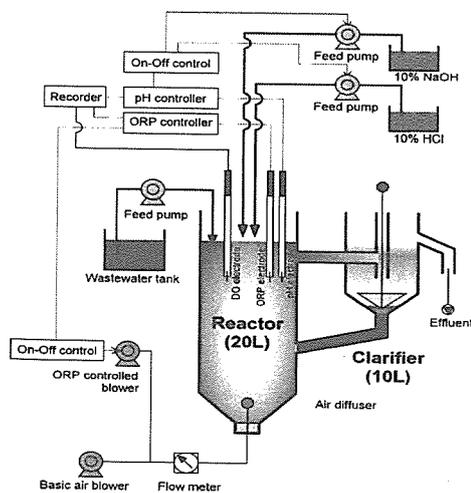
## 2.3 鉄酸化細菌に対する塩濃度の影響評価

クーロメーター(大倉電気製)を用いて、鉄酸化細菌に対する塩濃度の影響を調査した。本装置では6系列の比較実験が可能である。まず、Fe<sup>2+</sup>濃度を100 mg·l<sup>-1</sup>(塩化第一鉄)、リンを0.5 mg·l<sup>-1</sup>(リン酸水素二カリウム)、窒素を2.5 mg·l<sup>-1</sup>(塩化アンモニウム)含む初期pHが3の人工排水を作成した。その後、塩濃度を塩素イオンとして、0~18,000 mg·l<sup>-1</sup>または、0~65,000 mg·l<sup>-1</sup>になるように6段階に調整した。人工排水270 mlに、先に述べた方法で馴養した鉄スラッジを30ml、または、既報<sup>10)</sup>で報告した*Thiobacillus ferrooxidans*を含む鉄スラッジ30mlを添加した。その後、クーロメーター(大倉電気製)を用いて水温が20°Cの条件で最長24時間反応させ、各サンプルの酸素消費量を経時的に計測し、酸素消費量を経時的に計測すると共に、所定時間後の試料について、Fe<sup>2+</sup>と塩素イオン濃度を分析した。

## 2.4 微生物群集構造解析

鉄酸化スラッジの混合液をNaOHで中和し、この沈澱上澄液を採取した。上澄液を0.2 μmのフィルタでろ過し、10mM Tris-HCl(pH9.0), 1mM EDTA, 10mM NaClで洗浄して懸濁させ、フィルタ上に残った残渣を回収し、Nagashimaらの方法<sup>14)</sup>に基づいてDNAを抽出した。精製したDNAを鋳型としてPCR法により16SrRNA遺伝子の約400bpの領域を増幅した。なお、使用したプライマーをTable 2に示す。DNAポリメラーゼは、AmpliTaq Gold™(Applied Biosystems)、サーマルサイクラーはGeneAmp PCR System 9600(Applied Biosystems)を用いた。PCRの反応条件は、94°C, 7min + (94°C-30sec; 65~55°C-60sec; 72°C-90sec)×20サイクル(ここで2サイクル毎にアニーリング温度を1°C下げた(65~55°C)) + (94°C-30sec; 55°C-60sec; 72°C-90sec)×15サイクル+72°C, 10minとした。PCR反応後、Dcode DGGE Complete System(BioRad)を用いてDGGE解析を行った。電気泳動は、ゲル濃度勾配を5~10%、変性剤(尿素を使用)濃度勾配を電気泳動方向に30~60%とした変性ポリアクリルアミドゲルを用い、電圧130Vにて7時間泳動した。泳動後のゲルをSYBR Green(TAKARA)で染色して、UV310nm照射下でDNAバンド像を観察した。

DGGE解析で得られた個々のDNAバンドを切り取り、DNAを抽出・回収して約400bpの塩基配列を解析した。配列決定のPCR反応はABI PRISM BigDye Terminator Kit(Applied Biosystems)にて、プライマーはTable 3に示す518fおよび907rを用いた。ABI PRISM 377 DNA Sequencer



**Fig.1** Experimental apparatus

**Table 2** PCR primer

Primer	Base sequence
GC-NS3f	5'-GCclamp-GCAAGTCTGGTGCCAGCAGCC-3'
907r	5'-CCGTCAATTCCTTT(A/G)AGTTT-3'
GC clamp: CGCCCGCGCGCCCGCGCCCGTCCGCGCCCGCCCGCCCG	

**Table 3** Sequencing primer

Primer	Base sequence
518f (Forward)	5'-CCTACGGGAGGCAG-3'
907r (Reverse)	5'-CCGTCAATTCCTTT(A/G)AGTTT-3'

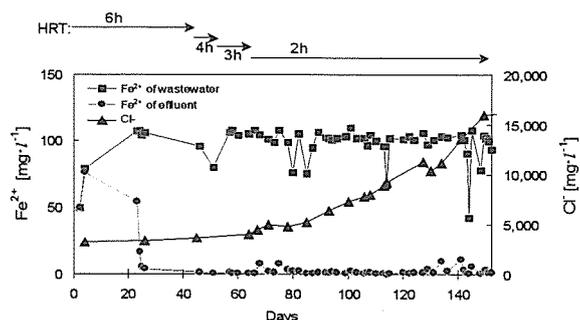


Fig.2 Time course changes of  $\text{Fe}^{2+}$  and  $\text{Cl}^-$  concentration of artificial wastewater and effluent (pH: 3; Water temperature: 20~23°C)

にて塩基配列を解析し、DNA塩基配列データベース (GenBank/EMBL/DDBJ) にて相同性検索して微生物種を推定した。

### 2.5 水質分析方法

人工排水及び処理水は、3回/週採取した。ろ過試料は、直ちに5Cろ紙でろ過した。 $\text{Fe}^{2+}$ 、塩素イオンは工場排水分析方法 (JISK0102) に従い3回/週分析した。反応槽で生成したスラッジのMLSSを、下水試験方法に従い、1回/週分析した。反応槽のORP, DO, pH, 水温は、連続測定し記録した。スラッジの粒度分布の測定は、レーザー回折式粒度分布測定装置 (島津製作所SALD-3000 S) を用いた。スラッジの酸素消費量はクーロメーター (大倉電気) を用い測定した。

## 3. 実験結果と考察

### 3.1 耐塩性を有する鉄酸化細菌の馴養

人工排水の塩濃度を徐々に上昇させ、耐塩性を有する鉄酸化細菌の馴養を試みた。人工排水、及び処理水の $\text{Fe}^{2+}$ 濃度、塩素イオン濃度の経時変化をFig.2に示す。

馴養開始当初 (塩素イオン濃度:  $3,000 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ ) の処理水には、人工排水と同程度の $\text{Fe}^{2+}$ が検出された。しかし、約2週間で $\text{Fe}^{2+}$ は徐々に減少しはじめ、馴養開始後25日目以降は排水中の95%以上の $\text{Fe}^{2+}$ が酸化された。この $\text{Fe}^{2+}$ の酸化性能は、HRTを6時間から2時間まで短縮しても、さらに、排水の塩素イオン濃度を順次 $3,000 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ から $15,000 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ まで高めても保持されていた。これらの結果から、塩素イオン濃度が $15,000 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ の塩濃度条件下でも、HRTが2時間で、 $\text{Fe}^{2+}$ を酸化できる鉄酸化細菌を活性汚泥から馴養できたと考えられた。

### 3.2 人工排水の連続処理

海水並みの塩濃度条件下 (塩素イオン濃度:  $20,000 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ ) で、7ヶ月間の連続実験を実施した結果をFig.3に示す。

排水中の $\text{Fe}^{2+}$ は、人工排水の $\text{Fe}^{2+}$ 濃度を $100 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ から $500 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ に上昇させた直後以外、全期間にわたって $\text{Fe}^{3+}$ まで酸化された。この結果から、今回馴養した耐塩性を有する鉄酸化細菌を用いれば、海水並みの塩濃度条件下でも $100 \sim 500 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ の $\text{Fe}^{2+}$ をHRTが2時間程度の条件で酸化できることが確認できた。

また、実験の進行とともに反応槽内のMLSS濃度も急増した。このMLSS濃度の上昇は、既報<sup>10)</sup>で述べたように主として水酸化第二鉄の生成によるものである。反応槽

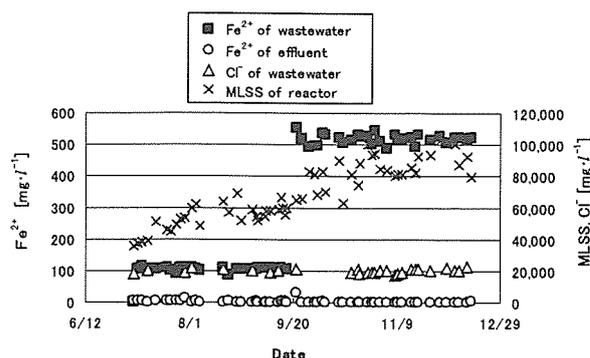


Fig.3 Time course changes of  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Cl}^-$  and MLSS concentration (pH: 3; Water temperature: 20~23°C)

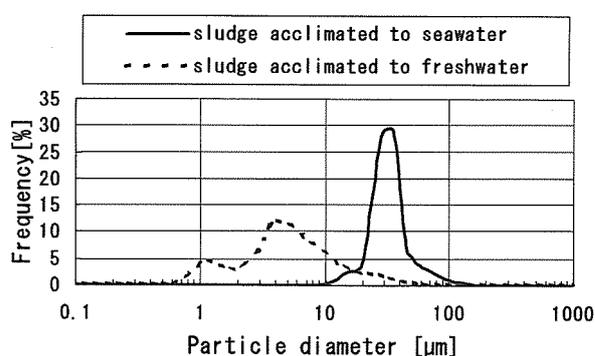


Fig.4 Comparison of produced  $\text{Fe}(\text{OH})_2$  particle size distribution between the sludge acclimated to freshwater and the sludge acclimated to seawater

で生成した水酸化第二鉄の粒度を測定したところ、粒径範囲は $10 \sim 150 \mu\text{m}$ 、50%粒径は $30 \mu\text{m}$ であった。この結果をFig.4に示す。既報<sup>10)</sup>の淡水・硫酸第一鉄の場合、生成した水酸化第二鉄の粒径範囲は $1 \sim 20 \mu\text{m}$ 、50%粒径は $6 \mu\text{m}$ 程度であった。このように粒半が増大した原因として、海水塩分の影響により水酸化第二鉄の造粒化が進行したことが推定される。この結果、スラッジの沈降性が良く、MLSS濃度が $100,000 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ 程度に上昇しても、沈澱槽からのスラッジの流出は見られなかった。反応槽内のMLSS濃度を高濃度に維持することが容易となるものと考えられる。

### 3.3 馴養した鉄酸化細菌に対する塩濃度の影響

#### 3.3.1 塩濃度の鉄酸化速度への影響

淡水で馴養した*Thiobacillus ferrooxidans*を含むスラッジ<sup>10)</sup>と海水並みの塩濃度条件下で馴養したスラッジに対する塩濃度の影響を比較した。塩濃度を塩素イオンとして、最大 $18,000 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ になるように6段階に調整した。この実験結果をFig.5に示す。横軸に塩素イオン濃度、縦軸に単位時間・単位MLSS当たりの鉄酸化速度として表現した。なお、鉄酸化速度は、実験初期の鉄酸化速度 (反応時間: 30分) である。

この結果、*Thiobacillus ferrooxidans*を含むスラッジの鉄酸化速度は、塩濃度が高まるにつれ低下した。例えば、塩濃度として塩素イオン濃度が $5,000 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ まで達すると鉄酸化速度は半減した。この結果は*Thiobacillus ferrooxidans*が塩濃度として1% (塩素イオン濃度:  $6,100 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ ) を越えると増殖できないとの報告<sup>15,16)</sup>と類似している。

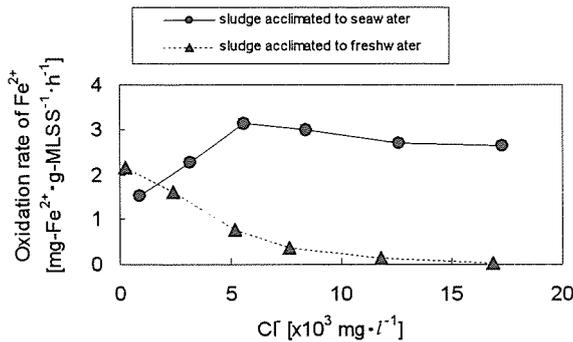
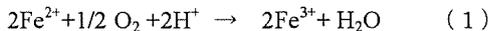


Fig. 5 Comparison of ferrous iron oxidation activity between the sludge containing *Thiobacillus ferrooxidans* and the sludge acclimated to seawater (pH : 3 ; Water temperature; 20°C)

一方、今回馴養した鉄酸化細菌を含むスラッジの鉄酸化速度は、人工排水の塩素イオン濃度が増加するにつれ増大し、塩素イオン濃度が $18,000 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ まで上昇してもほとんど低下しないことが確認できた。これらの結果から、今回馴養した鉄酸化細菌は、*Thiobacillus ferrooxidans*とは異なり、耐塩性を有する種であることが推定された。

また、鉄酸化に伴い、酸素消費が経時的に観察された。 $\text{Fe}^{2+}$ 酸化量/酸素消費量(質量比)は、平均7.3となった。 $\text{Fe}^{2+}$ 酸化反応を(1)式で記述した場合<sup>2)</sup>、 $\text{Fe}^{2+}$ 酸化量/酸素消費量は、6.98となり、今回の結果と近い値であった。このことから、鉄酸化反応が鉄酸化細菌による酸素消費に伴うものであることが強く示唆された。



### 3.3.2 排水中塩濃度の限界調査

今回馴養した鉄酸化細菌を用い、一定時間内で処理が可能なメッキ排水の塩濃度を調査した。人工排水の塩濃度を、塩素イオンとして最大 $65,000 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ (塩濃度: 10.7%)になるように6段階に調整した。実験結果をFig. 6に示す。横軸に人工排水の塩素イオン濃度、縦軸に24 h後の人工排水中の $\text{Fe}^{2+}$ 濃度を示す。本実験では反応時間を24 hとしたが、塩濃度の影響が無ければ、実験後の $\text{Fe}^{2+}$ は検出されない。この結果から、人工排水の塩素イオン濃度が $46,000 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ (塩濃度: 7.6%)であっても、 $\text{Fe}^{2+}$ は24 h後にほぼ完全に酸化されていた。しかし、塩素イオン濃度が $65,000 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ の濃度(塩濃度: 10.7%)の条件下では、処理水中に $\text{Fe}^{2+}$ が80%近く残留した。

この結果から、今回馴養した鉄酸化細菌を排水処理に適用する場合、排水の塩濃度は8%程度以下であることが望ましいと考えられる。

### 3.4 鉄酸化細菌の群集解析

前記条件で馴養した鉄酸化スラッジのPCR-DGGE解析

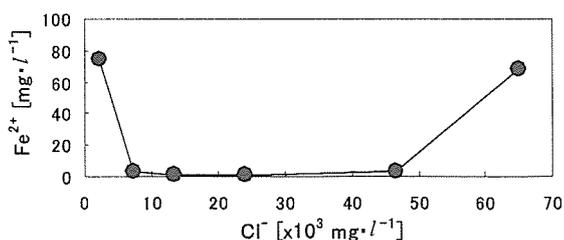


Fig. 6 Effect of salt concentration on ferrous iron oxidation by the sludge acclimated to seawater (pH : 3 ; Water temperature; 20°C)

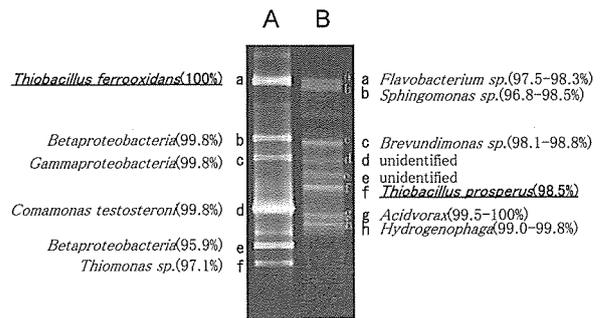


Fig. 7 DGGE separation patterns for PCR-amplified 16SrDNA segments derived from samples of the reactor treating artificial electroplating wastewater (lane A: sludge acclimated to freshwater; lane B: sludge acclimated to seawater)

を行った。比較として既報<sup>9,10)</sup>の硫酸第一鉄を添加した淡水系の人工排水によって馴養した鉄酸化スラッジについてもPCR-DGGE解析を行った。この結果をあわせてFig. 7に示す。この結果、いずれのスラッジについても複数種類の微生物の存在が検出された。微生物種について特筆点を以下に列挙する。

まず、淡水系の人工排水で馴養した鉄酸化細菌群のバンドaは、*Thiobacillus ferrooxidans*であると確認された。独立栄養性細菌である本菌は、最も一般的な鉄酸化細菌であり、硫酸系メッキ排水の鉄酸化性能を担う主要な細菌であると推定される。

一方、海水系の人工排水で馴養した鉄酸化細菌群のバンドfは、*Thiobacillus prosperus*と98.5%の相同性が確認され本菌に類似の菌株であると考えられた。Huberら<sup>12)</sup>は、*Thiobacillus prosperus*が*Thiobacillus ferrooxidans*と同様に独立栄養性細菌であり、6.0%の塩濃度まで耐えられる海洋性鉄酸化細菌であることを報告している。また、Kamimuraら<sup>13)</sup>は海水から単離した鉄酸化細菌の最適な塩濃度が2~4%であることを報告している。このような報告からも、今回のケースにおいても*Thiobacillus prosperus*に類似の菌株が、高濃度の塩存在下での鉄酸化活性の担い手である可能性が強く推定される。

なお、海水系の人工排水で馴養した鉄酸化細菌群のバンドには、*Thiobacillus prosperus*よりも相同性の高いものが他に見られるが、鉄酸化機能を有する細菌として確認されたものはない。

## 4. 結論

高濃度の塩素イオンを含有する電気メッキ排水中の鉄酸化処理に鉄酸化細菌を適用するため、耐塩性のある鉄酸化細菌の馴養と電気メッキ排水に含まれる $\text{Fe}^{2+}$ の酸化の可能性を検討した。この結果、以下のことを明らかにした。

1) 海水を添加した塩化第一鉄溶液、および、製鉄所安水処理の活性汚泥を用いて耐塩性のある鉄酸化細菌を馴養することができた。

2) 活性汚泥から馴養した鉄酸化スラッジに、 $\text{Fe}^{2+}$ を100または $500 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ を含む海水を連続投与したところ、海水並みの塩濃度でも反応槽のHRTが2時間の条件で $\text{Fe}^{2+}$ を安定して長期間継続して酸化できることが確認で

きた。

3) 馴養した鉄酸化細菌の鉄酸化速度に及ぼす塩濃度の影響を検討した結果、塩濃度として塩素イオン濃度が $5,000 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ まで鉄酸化速度が上昇し、また、塩濃度が海水なみ(塩素イオン濃度: $20,000 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ )であっても鉄酸化活性を有し続けることを確認した。

4) 今回馴養した鉄酸化細菌を排水処理に適用する場合、耐塩性の限界は、排水の塩濃度として、8%程度と推定された。

5) 反応槽中のスラッジ中の微生物群集を解析した結果、海洋性の鉄酸化細菌*Thiobacillus prosperus*に類似した鉄酸化細菌が検出された。群集解析結果および耐塩性調査の結果から、鉄酸化性を担う主要な細菌は*Thiobacillus prosperus*に類似の菌株である可能性が強く示唆された。

今後、今回、活性汚泥から馴養した耐塩性のある鉄酸化細菌の同定や実メッキ排水への適用検討を進める予定である。

(原稿受付 2006年8月31日)

(原稿受理 2007年1月23日)

#### 参 考 文 献

- 1) Fabiani, C. (1992) Recovery of metals ions from waters and sludges, *ENEA*, 1-35.
- 2) Rao, S.R., Finch, J.A. and Kuyucak, N. (1995) Ferrous- Ferric oxidation in acidic mineral process effluents: comparison of methods, *Minerals Engineering*, **8** (8), 905-911.
- 3) Imaizumi, T. (1986) Some industrial application of inorganic microbial Oxidation in Japan, *Biotechnology and Bioengineering Symp.*, **16**, 363-371.
- 4) Diz, H.R. and John T. Novak (1998) Fluidized bed for removing iron and acidity from acid mine drainage, *Journal of Environmental Engineering*, **124**(8), 701- 708.
- 5) Diz, H.R. and Novak, J.T. (1997) Heavy metal removal in an innovative treatment system for acid mine drainage, *Proc Mid-Atl Ind Hazard Waste Conf*, **29**, 183-192.
- 6) 三木理, 加藤敏朗 (2000) 活性汚泥から馴養した鉄酸化細菌による  $\text{Fe}^{2+}$  の酸化, 第 37 回下水道研究発表会講演集, 1053-1055.
- 7) 三木理, 加藤敏朗 (2001) 活性汚泥から馴養した鉄酸化細菌による  $\text{Fe}^{2+}$  の酸化, 第 35 回水環境学会年会講演集, 113.
- 8) 三木理, 加藤敏朗 (2001) Oxidation of  $\text{Fe}^{2+}$  by Iron Bacteria Acclimated from Activated Sludge, *IWA Congress*.
- 9) 加藤敏朗, 伊藤公夫, 小野信行, 三木理 (2002) 活性汚泥から馴養した鉄酸化細菌群集解析, 第 36 回水環境学会年会講演集, 52.
- 10) 三木理, 加藤敏朗, 実原幾夫 (2006) 鉄酸化細菌を活用したスラリー型反応装置による電気メッキ排水からの金属回収, *水環境学会誌*, **29**(3),47-52.
- 11) D.Park, D.S.Lee, J.M.Park, H.D.Chun, S.K.Park, I.Jitsuhara, O.Miki, T.Kato (2005) Metal recovery from electroplating wastewater using acidophilic iron oxidizing bacteria: pilot-scale feasibility test, *Ind. Eng. Chem. Res.*, **44**, 1854 - 1859.
- 12) H.Huber and K.O.Stetter (1989) *Thiobacillus prosperus* sp. nov., represents a new group of halotolerant metal- mobilizing bacteria isolated from a marine geothermal field, *Arch. Microbiol.*, **151**, 479-485.
- 13) K.Kamimura, K.Kunomura, S.Wakai, K.Murakami, T.Sugio (2001) Some properties of a novel obligately autotrophic iron-oxidizing bacterium isolated from seawater, *Hydrometallurgy*, **59**, 373-381.
- 14) Nagashima, K. et al. (2000) A simple and sensitive polymerase chain reaction method dor the detection of food-related bacteria, *Food Sci. Technol. Res.* **6**(2), 115-118.
- 15) N.Lazaroff (1963) Sulfate requirement of iron oxidation by *Thiobacillus ferrooxidans*, *J.Bacteriol*, **85**, 78-83.
- 16) W.E. Razzell, P.C. Trussel (1963) Isolation and properties of an iron-oxidizing *Thiobacillus*, *J.Bacteriol*, **85**, 595-603.