

微生物を利用した水銀汚染土壌の浄化技術

根岸敦規 ^{*1}

水銀に対して耐性が有り、水銀を気化する能力を持つ鉄酸化細菌を用い、その水銀気化が微生物のどこで行われているかを、チトクロームc酸化酵素に着目して、水銀の還元気化活性を測定し確認した。その結果、チトクロームc酸化酵素の働きにより気化活性が生じていることが明らかになった。また、この菌を用いて実大規模の水銀汚染土壌の浄化実証試験を実施した結果、菌を添加したものは、12時間後に環境基準以下まで浄化がすることができた。この結果、鉄酸化細菌を利用することで、常温で汚染土壌から水銀を分離・浄化できることが可能となった。

キーワード：鉄酸化細菌、水銀汚染土壌、還元気化、バイオレメディエーション

1. はじめに

水銀化合物は自然界に存在するほか、かつては化学工業で使用され、温度計や電池などにも用いられていた。水銀は自然界において、0価から+2価の酸化状態で存在している。水銀化合物の中で2価の水銀イオン（以下、 Hg^{2+} ）と脂肪に溶解するアルキル水銀（ CH_3Hg^+ ）は生物にとって高い毒性を有しており、重大な公害も発生したため、土壤溶出量基準で0.0005mg/L以下（アルキル水銀は検出されないこと）と厳しい規制がなされている。

水銀に汚染された土壌は、水銀化合物が約360°Cから580°Cで昇華する性質を持つことを利用し、加熱処理により土壌から分離して浄化する方法が一般的に行われている。処理には加熱のための多大なエネルギーを必要とする。一方、常温での微生物による水銀の還元能力は古くから知られており、水銀還元酵素を持つ多くのグラム陰性菌、グラム陽性菌を利用した水銀の気化処理の研究が続けられている^{1),2)}。また、化学合成独立栄養細菌である鉄酸化細菌 (*Acidithiobacillus ferrooxidans*) は水銀耐性に特に優れ、従来の菌とは異なる2価鉄存在下における水銀気化活性が見出されている^{3),4)}。

本報では、水銀耐性をより高めた鉄酸化細菌 (MON-1株) を用い、浄化機構の解明と水銀汚染土壌浄化へ適用性を検討するために実施した実証試験結果を報告する。

2. 浄化機構

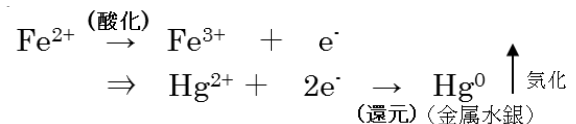
2-1. 鉄酸化細菌

鉄酸化細菌は2価の鉄イオン（以下、 Fe^{2+} ）を3価の鉄（以下、 Fe^{3+} ）に酸化する際に生じる電子をエネルギー源

として生育できる化学的独立栄養細菌である。鉄のほか、元素状硫黄 (S^0) を酸化しても生育できる。

多くの微生物には、細胞内に侵入してきた水銀を気化する機構が備わっているが、水銀濃度が高いと生育に必要な代謝の働きが止まり、死滅する。バイオレメディエーションの室内実験において、浄化に関与する微生物の活動を停止させるために塩化水銀が用いられるのはこの作用を利用するためである。

鉄酸化細菌は細胞内の水銀気化機構のほかに、細胞膜で同様な機構を持っている^{3),4)}。 Fe^{2+} から Fe^{3+} への酸化で得た電子を細胞膜表面で土壌中の Hg^{2+} に渡して、 Hg^{2+} を金属水銀（以下、 Hg^0 ）に還元する。 Hg^0 は常温で容易に気化して土壌から分離できるので、土壌を浄化することができる（下式）。



今回の浄化に用いる微生物は、鉄酸化細菌の *A. ferrooxidans* MON-1株で、日本の温泉地の土壌から採取された SUG 2-2株⁵⁾を Hg^{2+} 濃度を増加させた培地で培養し、単離した水銀耐性菌である。図-1に SUG2-2株と MON-1株との水銀気化活性の比較を示す。1.0 μ Mの水銀存在下における水銀気化活性では、MON-1株は SUG 2-2株の約2倍の能力を有しているが、さらに高濃度の5 μ Mの濃度では、MON-1株の水銀気化活性は SUG 2-2株の約9倍の能力を持つことがわかる。一方、水銀耐性の無い鉄酸化細菌 AP19-3株（水銀感受性株）は、どちらの濃度でも水銀を気化する能力を持っていない。水銀耐性を有する SUG2-2株と MON-1株は、塩化水銀、アルキル水銀を還元することが判明している⁶⁾⁻¹⁰⁾。

*1 先端技術研究部

写真-1にMON-1株の電子顕微鏡写真を示す。この菌の至適温度は約30℃、至適pHは2.5であり、一般的な鉄酸化細菌と同様な生理的性質を示す。水銀耐性は40μMの濃度まで活性が確認されている。

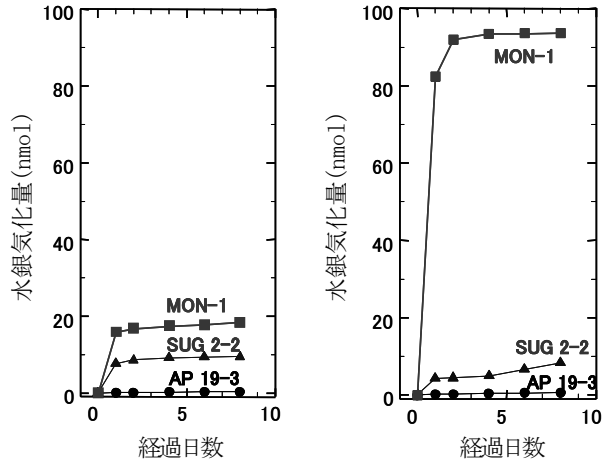


図-1 *A. ferrooxidans* の水銀酸化活性
水銀濃度左：1.0μM、右：5.0μM

AP19-3(●)：水銀感受性株、SUG2-2(▲)、MON-1(■)：水銀耐性株

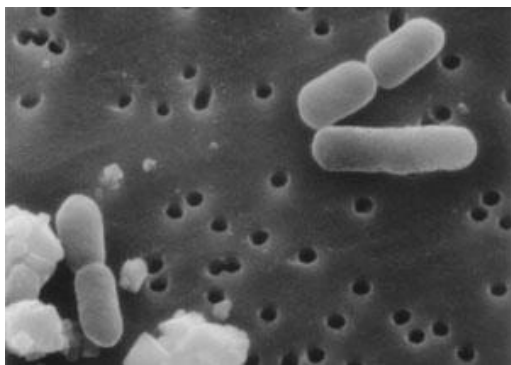


写真-1 *A. ferrooxidans* MON-1株

2-2. 水銀酸化の測定

(1) 実験方法

水銀還元酵素は多くのグラム陰性菌、グラム陽性菌で、その存在が確認されており、水銀酸化処理の研究が進められている。SUG2-2株で存在が確認された2価鉄依存性水銀還元酵素を、チトクロームc酸化酵素を精製し、水銀酸化活性を測定することによりその機構の解明を試みた。TMPD (2,3,5,6-tetramethyl-p-phenylenediamine) は、チトクロームc酸化酵素の特異的の基質として知られている。好気性雰囲気、嫌気性雰囲気、チトクロームc酸化酵素の代わりに電子供与体としてTMPDを用いて水銀の酸化が生じるかを検討した。

① 培養条件

鉄酸化細菌には前述の水銀耐性菌であるSUG2-2株、MON-1株、比較として水銀感受性菌のAP19-3株を用いた。各々の菌はFeSO₄・7H₂O：30g、(NH₄)₂SO₄：3g、K₂HPO₄：

0.5g、MgSO₄・7H₂O：0.5g、KCl：0.1g、Ca(NO₃)₂：0.01gを含むpH=2.5に調整した2価鉄培地70リットルを用い30℃の好気性下で1週間培養した。

② 洗浄細胞、細胞膜、細胞質の分離

培養液は鉄の沈殿を除くためにNo.2ろ紙でろ過後、遠心分離機で分離した。分離した菌を0.1Mのリン酸ナトリウム緩衝溶液(pH=7.5)で3回洗浄した。洗浄細胞はフレンチプレス120N/mm²で破壊した。105,000gでの遠心分離後、細胞質は上澄み溶液に細胞膜は残渣に存在するので、残渣をさらに0.1Mのリン酸ナトリウム緩衝溶液(pH=7.0)に分散させ洗浄、分離精製した。

③ チトクロームc酸化酵素の精製

MON-1株の細胞膜を1.5%の界面活性剤オクチルグルコシドで可溶化後、pH4.5の0.1M酢酸緩衝液で透析し、沈殿する画分を2回のCMカラムクロマトグラフィーで分画し精製した。

④ TMPD酸化活性の測定

0.01mMの塩化水銀(HgCl₂)を含む0.1Mβ-alanine-SO₄²⁻buffer(pH3.0,2.0ml)に0.2M TMPD(100μl)を加えた培地に各鉄酸化細菌の休止細胞を0.005mg添加し30℃、嫌気状態で培養し、菌の増殖を566nmの吸収で測定した。

⑤ TMPD依存性水銀酸化活性の測定

上記培養装置に水銀蒸気をトラップするために過マンガン酸カリウム溶液を加えたフラスコを入れた。気化水銀濃度は原子吸光分析装置で測定した。

(2) 結果および考察

図-2に水銀感受性菌、耐性菌の鉄酸化活性、チトクロームc酸化酵素活性、TMPD酸化活性を測定した結果を示す。鉄酸化活性は水銀耐性が強くなるほど比活性が増大した。チトクロームc酸化酵素活性、TMPD酸化活性も同様に、水銀耐性が強くなる株の順に増大した。この結果は、水銀耐性が強化されるほど鉄酸化酵素系の重要成分であるチトクロームc酸化酵素活性が強化されることを示唆している。

次にMON-1株の洗浄細胞を用い、TMPDを電子供与体にして水銀の酸化が起こるかどうかを検討した。TMPDはチトクロームc酸化酵素の直接の基質として知られている

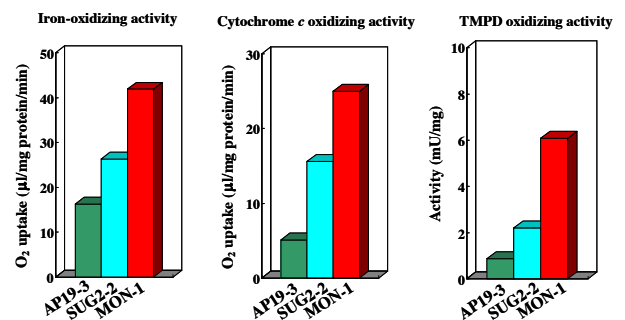


図-2 鉄酸化細菌の酸化活性測定

ので、チトクローム *c* の還元型から水銀の気化が起こるかどうかを検討した。図-3 に嫌気状態における水銀気化量の測定結果を示す。TMPD を添加した場合は、添加しない場合に比較して多量の水銀の気化が起こった。この水銀気化量の差は TMPD 依存性の水銀気化活性と考えられた。煮沸した洗浄細胞を用いた場合、0.5 mM のシアン化カリウムを添加してチトクローム *c* 酸化酵素を阻害した場合には水銀の気化は起こらなかった。この結果もチトクローム *c* 酸化酵素が水銀気化を行えることを強く示唆している。

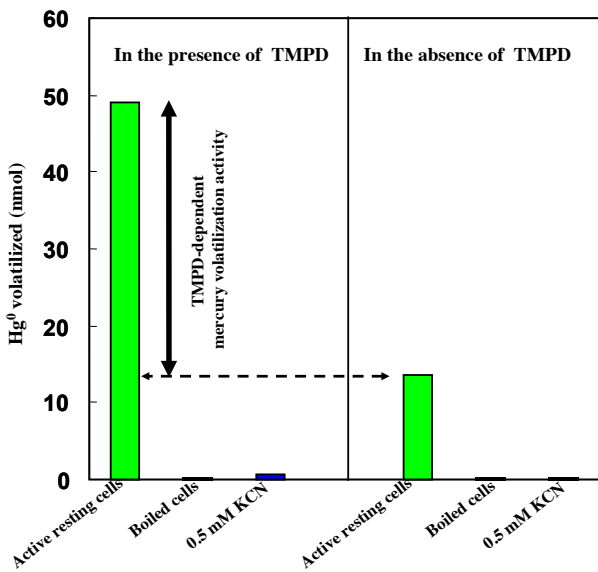


図-3 MON-1 株の TMPD 存在下での水銀の気化

最終精製のチトクローム *c* 酸化酵素 2.5 μg を用いて、シアン存在、非存在下で、TMPD を電子供与体にして Hg²⁺ を還元して Hg⁰ を生成できるかどうかを検討した。図-4 に結果を示す。この図に示すように、精製酵素は TMPD を電子供与体として水銀を気化することができた。チトクローム *c* 酸化酵素の阻害剤シアン (NaCN) は水銀の還元・気化反応を強く阻害している。

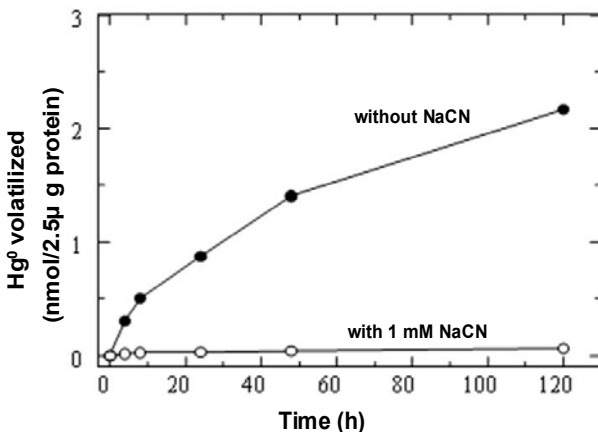


図-4 MON-1 株の TMPD 添加による水銀気化の影響

図-5 に MON-1 株の水銀還元機構模式図を示す。水銀イオン (Hg²⁺) と酸素の酸化還元電位は 0.82 と 0.85 と近い値であり、嫌気状態で水銀を気化できるのはこの理由によるものと考えられる。また、シアン化合物は末端酸化酵素を阻害することが知られており、精製酵素が同様に阻害され水銀の気化が生じないことから、水銀の還元はチトクローム *c* 酸化酵素のヘム鉄、CuB が関与していることが示唆された。高度水銀耐性鉄酸化細菌 MON-1 株は高いチトクローム *c* 酸化酵素活性と高い 2 価鉄依存性気化活性を有している一方、多くの細菌が細胞質内に持つ NADPH 依存性の水銀気化活性は SUG2-2 株と同程度であった。

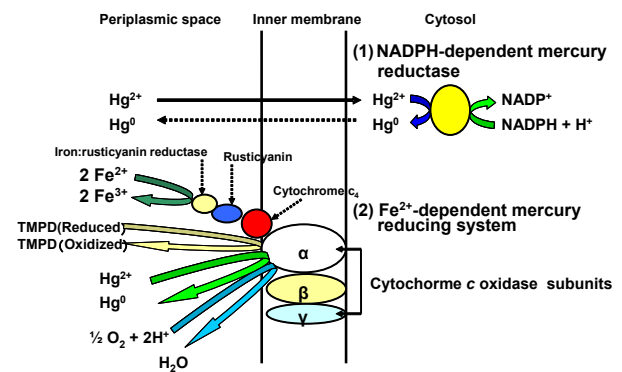


図-5 MON-1 株の水銀還元機構

自然界においては、Fe (III)、Mn (IV)、Te (IV) 等の金属イオンや、より有毒な Cr (VI)、Hg (II)、Pb (II)、Co (III)、Ag (I)、Mo (IV) 等の金属イオンは微生物的に還元されることが知られている。このような金属イオンを還元できる微生物は、自らの成長のエネルギー源としてそれらを利用し、有害金属から自らを守ることができると考えられる。Trurko ら¹¹⁾によると、グラム陰性菌である *Agrobacterium tumefaciens*、大腸菌、緑膿菌の呼吸鎖の末端酸化酵素が亜テレル酸塩 (TeO₃²⁻) の還元に関与していると報告しており、特に緑膿菌において、シアン化カリウムは特に亜テレル酸塩の還元を阻害していることが判明している。今回の結果と照らし合せると、チトクローム *c* 酸化酵素が金属抵抗性に対し呼吸と同様に重要な役割を果たすことが示唆される。

3. 鉄酸化細菌 (MON-1 株) を用いた実大規模の浄化実証試験

小規模、中規模浄化試験の結果¹²⁾を踏まえ、浄化効果の確認と品質管理手法を検討するため、実大規模で水銀汚染土壌の浄化実証試験を実施した。浄化装置の構成例を図-6 に示す。

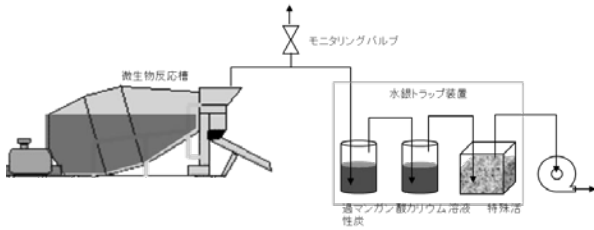


図-6 浄化装置構成例

(1) 浄化条件

表-1 に示す性状の水銀汚染模擬土壌 3m³ を鋼製タンクに準備し、反応装置 (6m³ 土壌混練用ミキサー) にバックホウを用いて投入した (写真-2)。

表-1 水銀汚染模擬土壌の性状

項目		備考
土質	シルト混合砂質土	
粒度	5mm以下	
含水率	17.40%	
土壌含有量	30mg/kg	土壌環境基準の2.0倍
土壌溶出量	0.10mg/L	土壌環境基準の200倍

浄化試験は以下の2条件で実施した。

①鉄塩、菌同時添加における浄化効果の確認

調整した水銀汚染模擬土壌 3m³ を反応装置に入れ、pH を3~4にするために、反応装置を高速で攪拌しながら適量の濃硫酸と硫酸第一鉄溶液と鉄酸化細菌培養液 (蛋白量 0.1g) を同時に添加・混和した。混和後、反応装置を低速で攪拌しながら12時間反応させた。

②鉄塩のみ添加の場合の浄化効果の確認

硫酸第一鉄のみで、還元される水銀量を把握するために、鉄酸化細菌培養液を添加しないで、①と同様な試験を実施し、水銀濃度減少量を測定した。

(2) 実証試験方法

反応装置の投入 (排出) 口に、気化したHg⁰ が漏れないように蓋をし、混合物をミキサー内の空気と接触するように攪拌し、水銀汚染土壌と MON-1 株を接触させた (写真-3)。ミキサー内は水銀除去装置の後段に設置されたエアポンプの吸気により、負圧に保たれた。MON-1 によって還元され気化した水銀は、ミキサーの蓋を貫通してミキサー内部まで挿入された配管を通じ、写真-4 に示す水銀除去装置へ導き、回収した。

各試験終了後、ミキサー内の土壌はミキサーを逆回転して排出させ、バックホウのバケットで受け止め、鋼製タンクへ戻した。

(3) 汚染拡散防止対策

反応装置は写真-5 に示すような汚染土壌対策用仮設

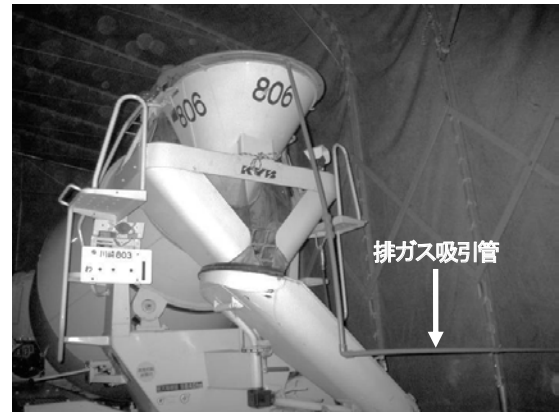


写真-2 微生物反応浄化装置

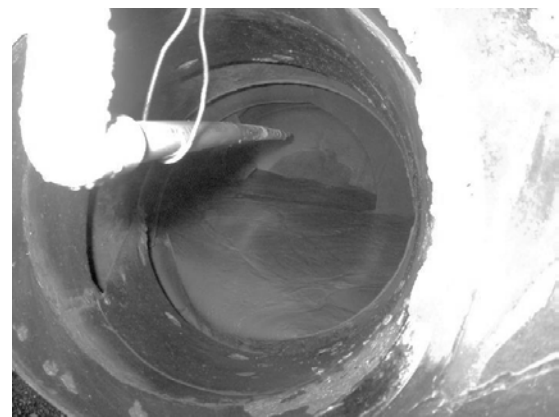


写真-3 ミキサー内部状況



写真-4 水銀除去装置

テント (間口 8m × 奥行 15m, 高さ 5.5m) 内に設置した。反応装置は負圧に制御され、水銀除去装置へと導かれているが、以下の汚染拡散防止対策を施した。

①仮設テント内部の汚染拡散防止対策

反応装置から出てくるHg⁰ 蒸気を含む排気は、液体トラップ装置と活性炭処理によりHg⁰ を取り除き、テント内に排出した。テント内は定期的に作業環境モニタリングを実施し、Hg⁰ 濃度が作業環境基準を満足していることを確認した。

②大気に対する汚染拡散防止対策

土壌の搬出入時などの Hg⁰ の拡散防止のために、仮設テント内を換気装置で負圧に保った。仮設テントの排気は、集塵装置および水銀用活性炭吸着塔（写真-6）を通して排出し、Hg⁰ 蒸気等が周囲に拡散しないように留意し、定期的にモニタリングを実施し漏洩が無いことを確認した。

③試験に伴う土壌・地下水汚染の防止対策

仮設テントは緩衝土の上に土木シートを敷設後、鉄板を敷いて養生し、さらに土木シートを敷設し、汚染土壌の地上および外部への漏洩を防止した。また、重機による土木シートの破損を防ぐために重機の通行箇所にゴムマットを敷いて土木シートを養生した。重機の動くスペースを明確にし、バリケードなどで安全通路を確保した。ミキサー、バックホウ、床面は適宜清掃した。



写真-5 仮設テント

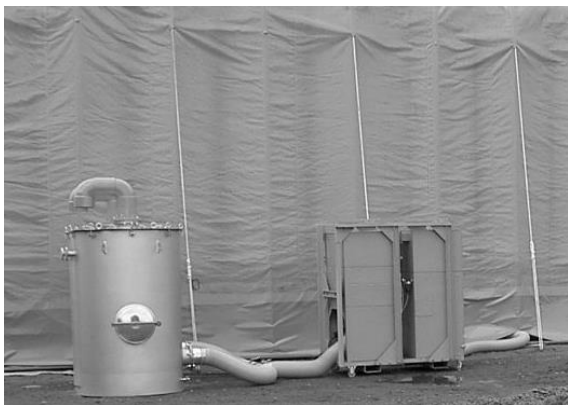


写真-6 テント内排ガス処理装置

(4) 実大規模浄化実証試験結果

浄化装置内の土壌を 1, 2, 4, 6, 12 時間後に採取し、水銀の土壌溶出量を測定した。図-7, 8 に無添加と菌添加の条件で試験を行った水銀の土壌溶出量の変化と pH の変化を示す。菌の添加後 2 時間で、第 2 溶出基準を満足し、12 時間後には、環境基準以下に浄化することができ、菌添加の効果が確認された。また、pH は菌を添加した場合、MON-1 株の活動により酸が生成するため、4 以下に抑えら

れていた。土壌含有量は菌添加で 5.0mg/kg、無添加の場合 25mg/kg であり、菌添加により土壌環境基準を満足する結果となった。気化した Hg⁰ は、水銀除去装置の前段に設置した過マンガン酸カリウム酸性溶液により 100%回収され、後段の水銀捕集用特殊活性炭からは検出されなかった。また、漏洩防止用にテント外部に設置してあるテント内排ガス処理装置の活性炭からも、検出されなかった。その他、テント内外の作業環境モニタリングにおいても、Hg⁰ は検出されなかった。

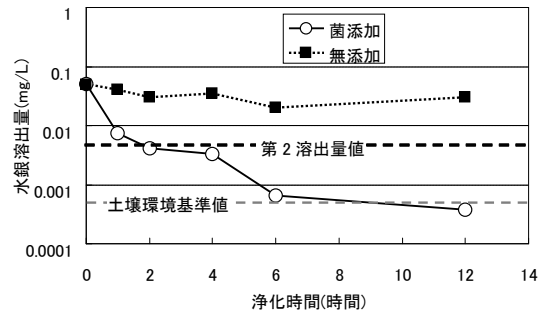


図-7 浄化時間と土壌溶出量の変化

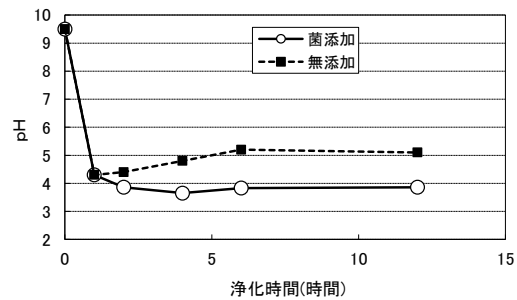


図-8 浄化時間と汚染土壌 pH の変化

なお、試験後の浄化が確認された土壌は、セメントを添加して、脱水・中和処理を施し、産廃汚泥として処分した。

(5) トリータビリティ試験

実際の汚染土壌に本工法を適用するためには、トリータビリティ試験を実施し、下記の各項目について事前に確認しておく必要がある。

①水銀含有量、溶出量の値:含有量が高く、溶出量が少ない場合、不溶化処理されている場合があるので、本技術が適用できない可能性がある。

②菌添加量、酸添加量の把握:実際の水銀汚染サイトではアルカリ性の高い土壌が多く存在するので、鉄酸化細菌の活動が可能な pH=4 以下に下げる必要がある。硫酸で酸性にすると、鉄酸化細菌の栄養塩として加える硫酸第一鉄に影響を与えないことが確認されているので、硫酸の添加量をトリータビリティ試験で確認する。

4. まとめ

水銀に対して耐性が有り、水銀を気化する能力を持つ鉄酸化細菌を用い、その水銀気化機構の解明を目指し、鉄の酸化還元機構が備わっているチトクローム *c* 酸化酵素に着目して、水銀の還元気化活性を測定することにより確認した。その結果、チトクローム *c* 酸化酵素の働きにより、鉄の酸化に伴う電子が、水銀イオンに渡され、金属水銀に還元されることが明らかになった。

この機構を利用した浄化実証試験で用いた水銀汚染土壌は、pH=10 程度のアルカリ性の高い土壌を想定した。このような土壌に対しては、10N 硫酸と 10%硫酸第一鉄を加え、pH=4.0 に調整し、12～24 時間低速撹拌で反応させることで鉄酸化細菌による浄化が可能になる。この硫酸と硫酸第一鉄のプロセスには以下の利点がある。

- ①時間を置くことで、難溶性の水銀化合物の溶出を促進させる効果がある。
- ②硫酸第一鉄のみで、溶出した Hg^{2+} を気化させることができる。

鉄酸化細菌による浄化は、MON-1 株を添加し、混和するために強めの撹拌をする。その後 12～24 時間ゆっくり撹拌する。 Fe^{2+} 濃度が減少した場合は、MON-1 株と硫酸第一鉄を加える。適宜、 Hg^0 をモニタリングして、浄化の確認を行う。

菌体の確保に関しては、電気培養による MON-1 株の大量培養が可能になり、通常の液体培養に比べ 100 倍以上の菌体量が得られるようになった。さらに、冷蔵保存が可能で、6 ヶ月以上にわたり水銀気化活性が低下しないことが確認されている。

本浄化実証試験に用いた鉄酸化細菌は、人畜無害であることが OECD の報告書¹³⁾でも認められており、環境省のバイオレメディエーション指針¹⁴⁾にも適合すると考えられる。

今後は、菌の水銀浄化に関与している酵素を分離・精製し製剤化することで、土壌に混合しやすい浄化工法を開発するとともに、土壌洗浄などの技術と組み合わせシス

テム化することで、複合汚染へ対応できるようにしていきたい。

水俣条約発効に向けて、気化した水銀の回収方法も検討しており、水銀のリサイクルにも取り組んでいきたい。

本技術は、安藤ハザマと菌の浄化機構を解明した杉尾剛岡山大学名誉教授、竹内文章岡山大学環境管理センター准教授と共に特許を取得（第 4578597 号）している。

参 考 文 献

- 1) J. B. Robinson, and O. H. Tuovinen, Microbiol. Rev., 48 pp.95-124, 1984.
- 2) A. Velasco, .P. Acebo and F. Flores, Extremophiles, 3, pp.35-43, 1999.
- 3) K. Iwahori, F. Takeuchi, K. Kamimura and T. Sugio, Appl. Environ., Microbiol., 66, pp.3823-3827, 2000.
- 4) T. Sugio, et. al., J. Biosci. Bioeng., 92, pp.44-49, 2001.
- 5) T. Sugio, H. Kuwano, A. Negishi, et. al., Biosci. Biotechnol. Biochem., 65, pp.555-562, 2001.
- 6) F. Takeuchi, et. al., et. al., Biosci. Biotechnol. Biochem., 65, pp.1981-1986, 2001.
- 7) T. Sugio, T. Tano and K. Imai, Agric. Biol. Chem., 45, pp.2037-2051, 1981.
- 8) K. Imai, T. Sugio, T. Tsuchida and T. Tano, Agric. Biol. Chem., 39, pp.1349-1354, 1975.
- 9) K. Y. Ng, et. al., Biosci. Biotechnol. Biochem., 61, pp.1523-1526, 1997.
- 10) A. Negishi, et. al., IBS2003 symposium in Athens, pp.449-455, 2003.
- 11) S. M. Trutko, et. al., Arch. Microbiol., 173, pp.178-186, 2000.
- 12) 根岸, 守谷, 竹内, 杉尾, 水銀汚染土壌の微生物による浄化工法の実証試験, 土木建設技術発表会 2009, pp.271-278, 土木学会 建設技術研究委員会, 2009 年 11 月
- 13) Consensus documentat on information used in the assessment of environment application involving *Acidithiobacillus*, ENV/JM/MONO(2006)3, OECD, 2006.
- 14) 経済産業省製造産業局生物化学産業課 環境省水・大気環境局総務課環境管理技術室「微生物によるバイオレメディエーション利用指針の解説」2005 年 7 月 (2010 年 3 月一部改訂)

Remediation Method for a Mercury-polluted Soil with a *Acidithiobacillus ferrooxidans*

Atsunori NEGISHI

A mercury resistant *Acidithiobacillus ferrooxidans* can reduce mercuric ions (Hg^{2+}) with ferrous iron as an electron donor under acidic conditions to give volatilized metallic mercury (Hg^0). The mechanism of volatilization exists in cytochrome *c* oxygenase. Large-scale remediation of mercury-polluted soil was conducted, and leached mercury concentration from the soil was less than criteria in 12 hours. This method indicates that under room temperature, the soil polluted mercury compounds can be remedied by using the ability of the *Acidithiobacillus ferrooxidans* MON-1 strain to reduce and volatilize.
