

微生物を利用した水銀汚染土壌の浄化技術

根 岸 敦 規

水銀に対して耐性が有り, チトクローム *c* 酸化酵素の働きにより水銀を還元気化する能力を持つ鉄酸化細菌を単離, 培養し, 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, 土壌溶出量基準で 0.0005 mg/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, 水銀汚染土壌の実証試験と維持管理手法の検討を実施したので, 浄化機構も含め紹介する。

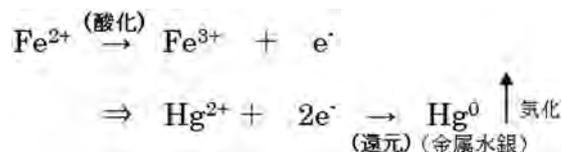
2. 浄化機構

(1) 鉄酸化細菌

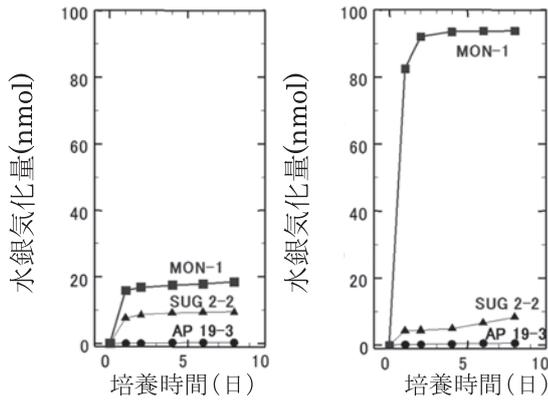
鉄酸化細菌は 2 価の鉄イオン (以下, Fe^{2+}) を 3 価の鉄 (以下, Fe^{3+}) に酸化する際に生じる電子をエネルギー源として生育できる化学的独立栄養細菌である。鉄のほかに, 元素状硫黄 (S^0) を酸化しても生育できる。

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, 浄化に参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)。

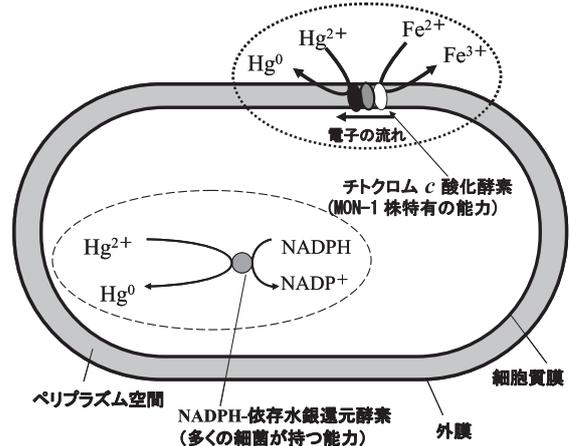


今回の浄化に用いる微生物は鉄酸化細菌の *A. ferrooxidans* MON-1 株で, 日本の温泉地の土壌から採取された SUG 2-2 株⁵⁾ を Hg^{2+} 濃度を増加させた培地で培養し, 単離した水銀耐性菌である。図 1 に SUG2-2 株と MON-1 株との水銀気化活性の比較を示す。1.0 μM の水銀存在下における水銀気化活性では, MON-1 株は SUG 2-2 株の約 2 倍の能力を有して



図一 *A.ferrooxidans* の水銀還元活性
水銀濃度左: 1.0 μM, 右: 5.0 μM

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



図二 MON-1 株の水銀還元機構

いるが、さらに高濃度の 5 μM の濃度では、MON-1 株の水銀還元活性は 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還元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)}。

写真一 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 40 μM の濃度まで活性が確認されている。



写真一 1 *A.ferrooxidans* MON-1 株

(2) 水銀還元活性

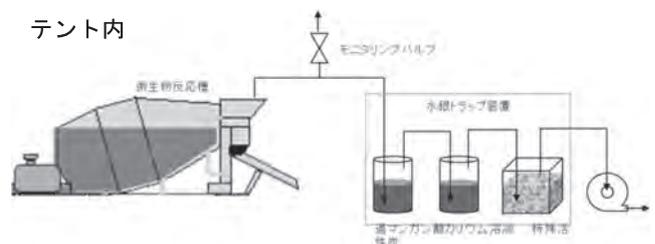
本浄化で用いた微生物の水銀浄化機構は、多くのグラム陰性菌、グラム陽性菌で確認されている NADPH 依存水銀還元酵素ではなく、鉄酸化細菌に特異的な Fe²⁺ 依存型水銀還元酵素で担っている。図二に MON-1 株の水銀還元の模式図を示す。図に示すように、鉄の酸化に伴う水銀の還元は、チトクローム c 酸化酵素が関わっていることが判明しており¹⁰⁾、細胞膜表面でこの反応が進行することが明らかになってい

る。この菌は、水銀を細胞内に取り込まないため、非常に効率的に水銀を還元処理することが可能である。

鉄酸化細菌以外の微生物において、Fe(III)、Mn(IV)、Te(IV) 等の金属イオンや生物にとって有毒な Cr(VI)、Hg(II)、Pb(II)、Co(III)、Ag(I)、Mo(IV) 等の金属イオンを利用して、同様な機構により還元、無害化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酸化還元反応に伴う電子を利用し、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緑膿菌の呼吸鎖のチトクローム c 酸化酵素が亜テルル酸塩 (TeO₃²⁻) の還元に関与していると報告している。この結果を本技術と照らし合せると、MON-1 株において、チトクローム c 酸化酵素が電子の受け渡し先として、酸素の代わりに Hg²⁺ を用いたと考えられ、非常に重要な役割を果たしていることが示唆される。

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三に示す。



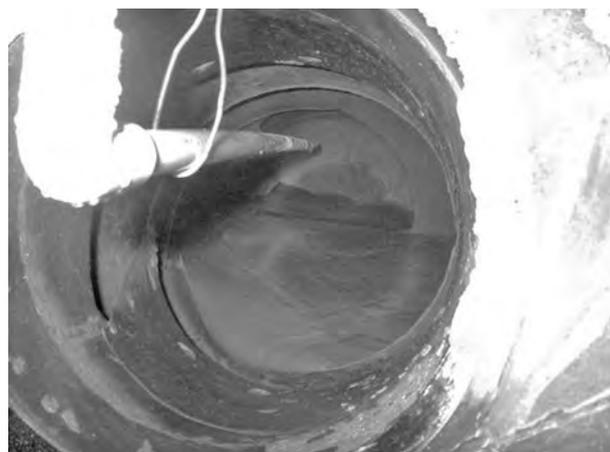
図三 浄化装置構成例

(1) 浄化条件

表一 1 に示す性状の水銀汚染模擬土壌 3 m³ を鋼製タンクに準備し、反応装置 (6 m³ 土壌混練用ミキサー) にバックホーを用いて投入した (写真一 2)。

表一 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 | 5 mm 以下 | |
| 含水率 | 17.40% | |
| 土壌含有量 | 30 mg/kg | 土壌環境基準の 2.0 倍 |
| 土壌溶出量 | 0.10 mg/L | 土壌環境基準の 200 倍 |



写真一 3 ミキサー内部状況



写真一 2 微生物反応浄化装置



写真一 4 水銀除去装置

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 3 m³ を反応装置に入れ、pH を 3 ~ 4 にするために、ミキサー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 0.1 g) を同時に添加・混和した。混和後、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場合の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 (写真一 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、写真一 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、バックホー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

反応装置は写真一 5 に示すような汚染土壌対策用仮設テント (間口 8 m × 奥行 15 m, 高さ 5.5 m) 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



写真—5 仮設テント



写真—6 テント内排ガス処理装置

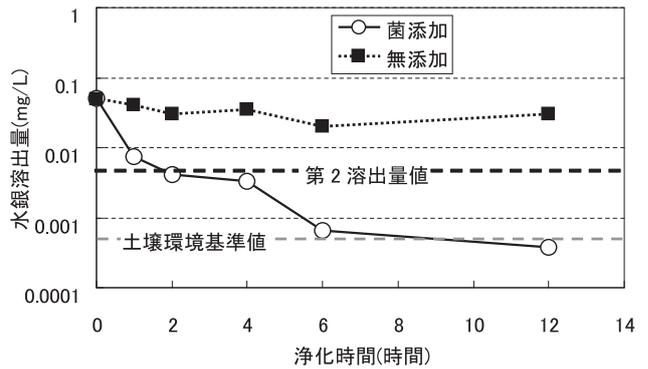
の排気は、集塵装置および水銀用活性炭吸着塔（写真—6）を通して排出し、 Hg^0 蒸気等が周囲に拡散しないように留意し、定期的にモニタリングを実施し漏洩が無いことを確認した。

③ 試験に伴う土壌・地下水汚染の防止対策

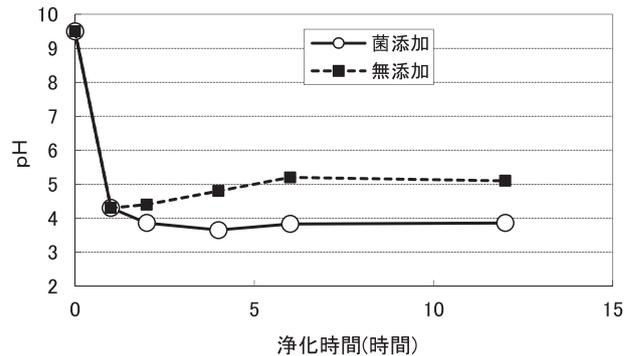
仮設テントは緩衝土の上に土木シートを敷設後、鉄板を敷いて養生し、さらに土木シートを敷設し、汚染土壌の地上および外部への漏洩を防止した。また、重機による土木シートの破損を防ぐために重機の通行箇所にゴムマットを敷いて土木シートを養生した。重機の動くスペースを明確にし、バリケードなどで安全通路を確保した。ミキサー、バックホウ、床面は適宜清掃した。

(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—4, 5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



図—4 浄化時間と土壌溶出量の変化



図—5 浄化時間と汚染土壌 pH の変化

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5.0 mg/kg、無添加の場合25 mg/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 Hg^0 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、 Hg^0 は検出されなかった。

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。

- ・水銀含有量、溶出量の値：含有量が高く、溶出量が小さい場合、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。
- ・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 以下に下げることが必要がある。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。

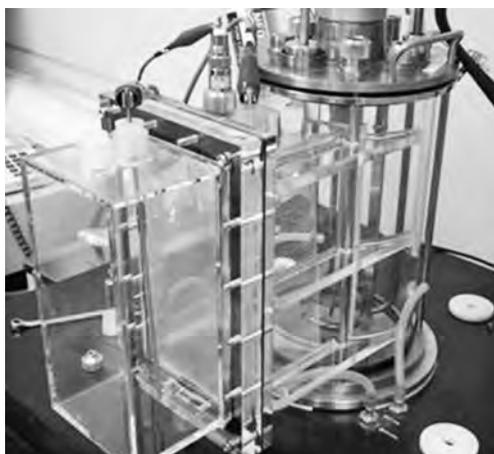
4. おわりに

本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。

- ・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。
- ・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、写真一七に示すような電気培養装置による 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。



写真一七 電気培養装置

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。また、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。

謝 辞

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教授と共に特許を取得（第 4578597 号）している。ここに誌面を借りて深く謝辞を申し上げる。

JCMA

《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., *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」平成 17 年 7 月（平成 24 年 3 月一部改訂）

【筆者紹介】

根岸 敦規（ねがし あつり）
安藤ハザマ 技術本部
技術研究所 先端・環境研究部
主任研究員（農博）

