

生物学的水銀を除去・回収するバイオリアクターの開発に関する研究

東北学院大学 工学部 学生会員 ○中畑 涼 東北学院大学 工学部 非会員 小野 哲矢
東北学院大学 工学部 非会員 簡 梅芳 東北学院大学 工学部 正会員 宮内 啓介
東北学院大学 工学部 フェロー会員 遠藤 銀朗

1. はじめに

我々人間は、産業革命の後に起こった経済発展により、自然環境に大きな影響や負荷をかけ環境問題が深刻化し、私たちの生活や健康に被害を及ぼしている。

本研究は、日本で引き起こされた公害病である水俣病の原因物質である水銀に注目している。熊本県で発生した熊本水俣病、新潟県で発生した新潟水俣病(第二水俣病)は、化学工場から未処理の高濃度の無機水銀やメチル水銀廃液を海や川に排出したことによって発生した。これを防止するために、生物学的水銀処理法は必要になると考えられる。

本研究室では、水銀化合物を分解し分解において生成された水銀イオンをさらに金属水銀へと還元する *Bacillus megaterium* MB1 株を利用して水銀除去を行うための基礎的研究を行ってきた。最終的には水銀除去のためのバイオリアクターの開発が到達目標とするものであるが、その基礎になる研究として、*B. megaterium* MB1 株の水銀除去能を中心に調査した。今回は、アルギン酸ゲル包括固定化法によって固定化した細菌に塩化水銀溶液を加え、水銀還元除去能を評価した。さらに、このような水銀除去・回収の実現性をみるため、固定化細菌への栄養補給および固定化菌体の繰り返し利用について検討したので報告する。

2. 実験方法

2.1 *B. megaterium* MB1 株を用いた水銀の最小阻害濃度試験

塩化水銀濃度が 0、10、20、40、80、160、320 μM になるように加えた 10ml LB 培地に、 $\text{OD}_{600\text{nm}}=0.1$ にした前培養菌液を各試験管に 90 μl 加え、37°C、160rpm で振動培養をした。20-24 時間経過した菌液の $\text{OD}_{600\text{nm}}$ を測定し、 $\text{OD}_{600\text{nm}}$ が 0.1 以下であった最小の塩化水銀濃度が最小阻害濃度と定めた。

2.2 固定化菌体の水銀浄化能の調査

前培養した菌液を 100ml LB 培地の入った三角フラスコに $\text{OD}_{600\text{nm}}=0.1$ になるように加え、37°C、160rpm で 3 時間培養を行った。その菌液を遠心分離によって集菌し、 $\text{OD}_{600\text{nm}}=1.5$ になるように必要な量の LB 培地と 4%アルギン酸ナトリウムの 1:1 の混合液懸濁し、0.1M 塩化カルシ

ウム溶液に滴下して固定化ゲルビーズを作成した。コントロール用として無菌のビーズも同様に作成した。

LB、1/5LB、水、3 種類の培地を用いて、40 μM 塩化水銀入りの各培地を 10ml 試験管に入れ、さらに 40 個の上記の固定化ゲルビーズを入れた。その後、インキュベーターに 37°C、160rpm の設定で実験を開始した。開始してから 36 時間まで実験を行い 0、3、6、9、24 時間に培地のサンプル 1ml、ビーズ 3 個をとりだし、それぞれ原子吸光計により水銀含量を測定した。

2.3 固定化菌体の持久性と繰り返し利用性の調査

2.2 の実験開始まで実験方法は同じである。ただし、固定化の状態での菌の活性を評価するため、LB 培地を含むゲルビーズと LB 培地を含まない食塩水で作成したビーズの 2 種類作成した。

40 μM の塩化水銀添加水培地を用いて実験を行い、実験開始してから 36 時間まで実験を行い、0、3、6、9、12、24、27、30、33、36 時間に培地のサンプル 1ml、ビーズ 3 個をとりだし水銀量を測定した。また、サンプルを採取し終わったら古い培地を新しい 40 μM の塩化水銀添加水培地 10ml 取り替えた。そして、取り替えた新しい培地を 1ml 採取し、-80°C に保存する。この実験を同時に 3 セット行った。

3. 実験結果および考察

3.1 *B. megaterium* MB1 株を用いた水銀の最小阻害濃度試験

水銀に耐性を有さない菌 *Bacillus subtilis* 168 株の水銀に対する感受性を明らかにし、また *B. megaterium* MB1 株はどの程度の耐性を持つのかを明らかにした最小阻害濃度の試験の結果は、Fig.3-1 に示したように、*B. megaterium* MB1 株については 80 μM の塩化水銀が最小阻害濃度であると評価することができた。また、*B. megaterium* MB1 株は、濃度が高くなるにつれて菌の増殖速度および水銀除去活性が落ちてくることが確認できた。

各水銀濃度による菌株の活性

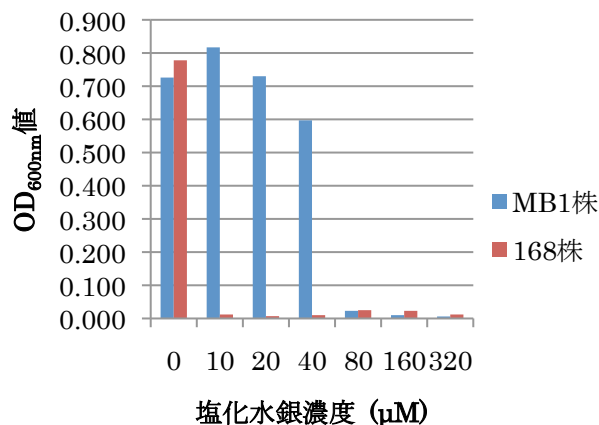


Fig. 3-1 各水銀濃度による菌の生育阻害状況

3.2 固定化菌体の水銀浄化能の調査

Fig. 3-2 に示したように、LB 培地は水銀除去を妨害すると思われるデータが得られた。また、1/5LB 培地の場合によるゲルビーズは菌が含まれているかどうかに関わらず、水銀含量が極端に他の培地より低いことが分かった。水培地の場合では、水銀除去率は3種類の培地において最も優れたことが分かりこの除去能は遊離菌体の水銀除去と変わらなかった(データ略)。菌が含まれていようと含まれまいと差があまりなかった。水培地が最も水銀除去に優れていたことから、以降の実験でも水培地を用いて実験を行った。

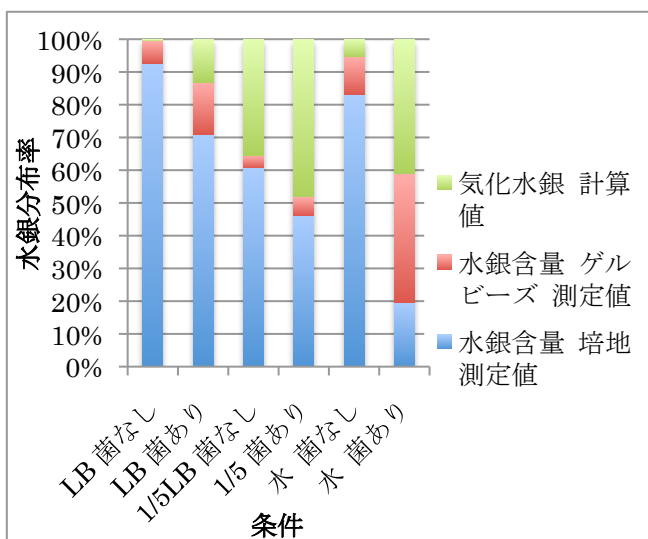


Fig. 3-2 各反応条件における 24 時間反応後の水銀の分布比

3.3 固定化菌体の持久性と繰り返し利用性の調査

固定化菌体の持久性と繰り返し利用可能性については、Fig. 3-3 に示したように、LB 培地ゲルビーズと食塩水ゲルビーズともに36時間以内では9回繰り返しても水銀除去能

が確認できた。ただし、Fig. 3-4 に示したように、ゲルビーズに含まれる水銀量の違いが見られたため、もっと長い時間で持久性をみる必要があると考えられる。Fig. 3-3 と Fig. 3-4 に示した結果から、水培地を用いた場合、時間の経過とともに、水銀がゲルビーズに蓄積されることが分かった。

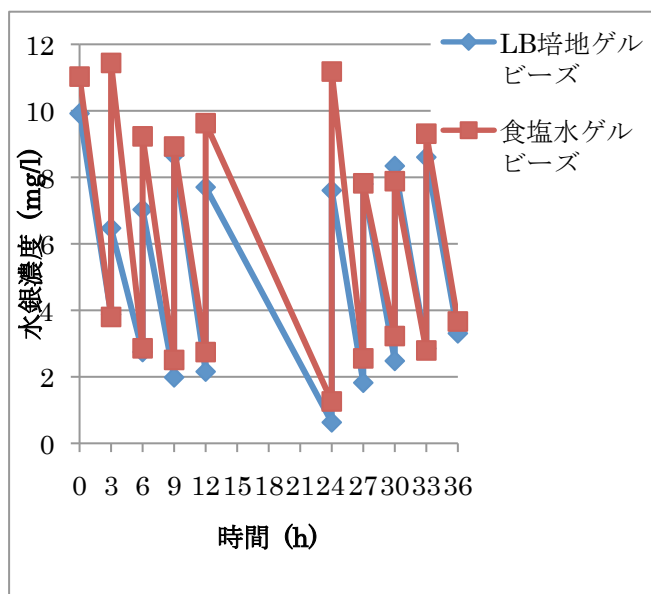


Fig. 3-3 LB 培地ゲルビーズと食塩水ゲルビーズによる培地水銀濃度

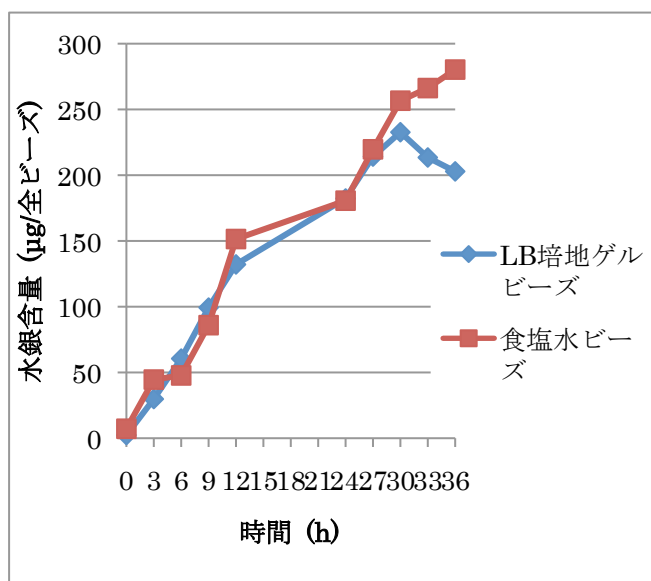


Fig. 3-4 ゲルビーズの水銀含量

4. おわりに

固定化菌体による水銀除去能力について、LB培地は水銀除去を妨げるような結果が得られ、水培地を用いた場合は高い除去率が得られた。この除去能は36時間持続でき、9回繰り返しても浄化活性が認められた。今後の課題として、1)ビーズに留まっている水銀の回収試験と2)固定化ゲルビーズをさらに長時間における持久性試験と3)*B. megaterium* MB1株の水銀除去能力水銀除去の能力を向上させる試験に取り組みたい。