クロレラによる Hg^{2+} 還元気化： 種々の環境条件の影響

山本 智, 柿井 一男, 白樫 高史

宇都宮大学工学部 (〒321-8585 栃木県宇都宮市陽東7-1-2)

[平成12年3月27日受理]

Volatilization of Mercury by Some *Chlorella* spp.: Influence of Various Environmental Factors

Satoru YAMAMOTO, Kazuo KAKII and Takashi SHIRAKASHI

Faculty of Engineering, Utsunomiya University
(7-1-2 Yoto, Utsunomiya, Tochigi 321-8585)

[Received March 27, 2000]

Summary

Mercuric ion volatilization by *Chlorella* spp. was investigated in inorganic media under light conditions. Volatilization of mercury was observed in all algal strains used. However, the amount of mercury volatilized was different from each other. More mercury was volatilized by the isolated strain in our university, *C. sorokiniana*, and *C. vulgaris* than by *C. fusca* var. *vacuolata* and *C. kessleri*. Taking the actual field conditions in account, effects of environmental factors such as pH, temperature, Cl^- concentration, and agitation of the media on the volatilization of mercury were also examined in this study.

Key words: *Chlorella* spp., volatilization of Hg^{2+} , environmental factors

1. はじめに

水銀は非常に高い毒性を有する重金属であるが、鉱物、岩石、土壌、水、大気など、天然に広く存在する元素でもある¹⁾。また、その化学的性質のため、工業的にも幅広い用途に用いられてきた²⁾。現在、その使用は先進諸国ではかなり制限されているが、経済発展の著しい国々では、未だ人為的起源の水銀放出の抑制が難しいのが現状である。例えば中国では、水銀含有化石燃料の燃焼、冶金工業、金鉱山、電気産業、家庭用乾電池、電球等が排出源となり、1980年代よりその大気、水、土壌中濃度が増加していることが報告されている³⁾。

このような有害な有機および無機水銀化合物をより無害な金属水銀に変換する微生物が自然環境中に存在する

ことが知られている⁴⁾。一方、先に我々は緑藻クロレラと Hg^{2+} の反応について検討を加え、特に明条件下でクロレラが Hg^{2+} を還元気化しやすいこと⁵⁾、水中に普遍的に存在している Cl^- が特に無電荷錯体 $[\text{HgCl}_2]^0$ を生成するときにクロレラ細胞内への Hg^{2+} の透過性が高くなり、 Hg^{2+} 還元気化性、クロレラに対する Hg^{2+} の毒性が高くなることを明らかにした⁶⁾。今回、このようなクロレラによる Hg^{2+} 還元気化が実際の環境中でどのように起こるかについて、通気、攪拌、pH、温度条件等を変化させて検討した。また、こうした Hg^{2+} 還元気化が種類の異なるクロレラにおいても見られるかについても併せて検討を行った。以下に得られた結果を報告する。

2. 実験方法

2. 1 クロレラの培養

特記なき場合、実験には本学工学部廃水処理施設の沈殿池から Gross-Jahn-Bernstein 培地を用いて分離したクロレラ (*Chlorella* sp.) を用いた⁷⁾。このクロレラはグリシンやグルコース資化能を有する。そこで実験には、グリシンを炭素源、窒素源として培養したクロレラを用いた。その他の詳細な培養方法は前報⁸⁾に従った。また、東京大学分子細胞生物学研究所細胞・機能高分子総合センターより分与された *C. sorokiniana* IAM C-212, *C. vulgaris* IAM C-106, *C. fusca* var. *vacuolata* IAM C-105, *C. kessleri* IAM C-208 の 4 種についても、同様にグリシン培地で培養し、実験に用いた。

2. 2 クロレラ濃度と比増殖速度の測定

クロレラ濃度は 750nm における濁度から求め、比増殖速度 μ (day^{-1}) は次式より求めた。

$$dX/dt = \mu X \quad (1)$$

ここで X はクロレラ濃度 (mg/ℓ) を示す。

2. 3 Hg^{2+} の還元気化実験

300ml の三角フラスコに $\text{Hg}(\text{NO}_3)_2$ 及び KCl を含む 22mM リン酸カリウム緩衝液 (pH6.0) 200ml を入れ、これにクロレラ懸濁液を加え、直ちにシリコン栓で密栓し、45mm の攪拌子で攪拌 (約 300rpm) しながら、窒素ガス (約 400ml/min) を溶液に通じ (以下、曝気という)、 Hg^{2+} の還元気化反応を追跡した。本報では特記ない場合、25℃ 恒温槽中、40W 蛍光灯 4 本の照射による明条件下で、添加する $\text{Hg}(\text{NO}_3)_2$ 濃度を $10\mu\text{M}$ 、クロレラ濃度を $200\text{mg}/\ell$ ($50\mu\text{mol}\cdot\text{Hg}^{2+}/\text{g}\cdot\text{cells}$ 相当) として実験を行った。ガス流量はマスフローコントローラー (上島製作所 (株) 製, 5850 TR) で測定した。また、好気性条件での気化実験では、窒素ガスの代りに空気を用いた。還元気化した Hg^0 は水銀トラップに捕捉した。水銀トラップは、(1+1) H_2SO_4 5ml と 6% KMnO_4 水溶液 5ml を混合して水で 50ml にしたもので、これを一定時間毎に交換した。このトラップ中の Hg^{2+} を測定することで気化した Hg^0 量を求めた。

2. 4 Hg^{2+} の測定

水銀トラップに 5% $\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$ 水溶液を加えて KMnO_4 を還元した後、水銀濃度計 (平沼産業 (株) 製, HG-1) を用い、トラップに捕捉された水銀の分析を行った。

2. 5 $[\text{HgCl}_n]$ 錯体存在比の計算

$[\text{HgCl}_n]$ 錯体存在比の計算は前報⁹⁾に従った。

2. 6 酸素発生速度の測定

100ml 枝付き三角フラスコを反応容器とし、あらかじめ窒素ガスで曝気して脱酸素したクロレラ懸濁液 ($200\text{mg}/\ell$, pH6.0) に気泡を残さないよう DO 電極を差し込んで密閉した。40W 白熱電球 1 本による照射下で、DO 計 (東京理化器械 (株) 製, DO-1 型) を用いて DO の変化を記録し、その直線の傾きから酸素発生速度 ($\text{mg}\cdot\text{O}/\text{g}\cdot\text{cells}\cdot\text{min}$) を算出した。

3. 結果及び考察

3. 1 クロレラによる Hg^{2+} 還元気化に与える曝気・攪拌条件の影響

pH を 6.0 とし、添加 Hg^{2+} 濃度を $10\mu\text{M}$ 、 Cl^- 濃度を 0 または 2mM とした明条件下での窒素曝気・攪拌下における Hg^{2+} の還元気化量を経時的に測定した (Fig. 1)。この pH6.0 においては、 Cl^- 無添加では Hg^{2+} のほぼ 100% が $[\text{Hg}(\text{OH})_2]^0$ として存在し (Cl^- 無添加系)、 Cl^- 2mM の共存下では 97.5% が無電荷の $[\text{HgCl}_2]^0$ 錯体として存在する ($[\text{HgCl}_2]^0$ 生成系)⁶⁾。前報において、窒素ガス曝気下の嫌気性条件で、特に無電荷錯体 $[\text{HgCl}_2]^0$ を生成するとき、クロレラによる Hg^{2+} 還元気化が急速化され、これが $[\text{HgCl}_2]^0$ 錯体の細胞膜透過性と関係していることを示した。こうした還元気化が好気条件下でも起こるかを調べるため、流量を同じ 400ml/min とした空気曝気・攪拌下で同様の実験を行った。Fig. 1 に示したように、空気曝気下の気化量は窒素曝気下よりも低下し、3 時間後ま

Fig. 1 Volatilization of Hg^0 under anaerobic and aerobic conditions in the light

- : N_2 -bubbling without Cl^- ;
- : Air-bubbling without Cl^- ;
- : N_2 -bubbling with Cl^- ($[\text{HgCl}_2]^0$ forming system);
- : Air-bubbling with Cl^- ($[\text{HgCl}_2]^0$ forming system)

では、 Cl^- 無添加系では窒素ガス曝気下の29%、 $[\text{HgCl}_2]^0$ 生成系では80%程度の気化量に留まった。しかしながら、24時間後の還元気化量は、 Cl^- 無添加系で窒素ガス曝気下の27.5 $\mu\text{mol/g-cells}$ に対して24.3 $\mu\text{mol/g-cells}$ であり、 $[\text{HgCl}_2]^0$ 生成系では33.3 $\mu\text{mol/g-cells}$ に対して33.1 $\mu\text{mol/g-cells}$ とほぼ同程度であった。このように、 Hg^{2+} が細胞内への透過性の高い $[\text{HgCl}_2]^0$ を生成している場合には、通気ガスの種類による気化量に大きな違いはなかったが、 $[\text{Hg}(\text{OH})_2]^0$ として存在する場合には実験初期に大きな差が見られた。

また、通常の還元気化実験では、スターラー攪拌した試料溶液中に窒素ガス曝気を行ったが、このような攪拌や曝気が還元気化に与える影響についても検討した。すなわち、水中曝気の代りに、窒素ガスをフラスコの上部に400ml/minの流量で通気し、スターラー攪拌の有無における Hg^{2+} の還元気化の経時変化を調べた (Fig. 2)。窒素ガス通気・攪拌の場合には、 Cl^- 無添加系及び $[\text{HgCl}_2]^0$ 生成系とも還元気化速度が大きく低下し、1時間後の気化量はそれぞれ通常の窒素ガス曝気・攪拌条件の12%、23%に留まった。しかし、両系とも12時間以降は曝気・攪拌条件と大きな違いは見られなかった。また、スターラー攪拌無し (静置条件) で通気した場合では、還元気化速度がさらに低下し、24時間後の気化量は両系とも曝気・攪拌条件の約50%に留まった。

次に、窒素ガス曝気・攪拌条件において、その流量を25から400ml/minの範囲で変化させ、水銀還元気化量を初期の気化量の大きい $[\text{HgCl}_2]^0$ 生成系で検討した。ここでは、実験開始後1時間までの還元気化の経時変化

Fig. 2 Effects of bubbling and stirring on the volatilization of Hg^0 by our *Chlorella* sp. isolate in the light

- , ●: N_2 -bubbling with stirring;
- △, ▲: N_2 -sparging with stirring;
- , ■: N_2 -sparging without stirring

Fig. 3 Volatilization of Hg^0 at various flow rates of N_2 gas under bubbling and stirring conditions in the light in $[\text{HgCl}_2]^0$ forming system

を測定した (Fig. 3(a))。この概して20から40分までの変化の傾きから Hg^{2+} 還元気化速度を求め、Fig. 3(b)に示した。曝気量が25から100ml/minまでは曝気量に比例して還元気化速度が増加し、これ以上では約0.63 $\mu\text{mol/g-cells} \cdot \text{min}$ とほぼ一定であった。

Hg^0 の水への溶解度は25℃で0.125 μM と低く、同温度における Hg^0 の飽和蒸気圧は $1.84 \times 10^{-3} \text{ mmHg}$ と高い。本実験で見られた曝気または通気・攪拌方法の違いによる Hg^{2+} 還元気化速度の変化は、生成した Hg^0 の気相への移行の差によるものと考えられる。このことから、環境中の静水中で藻類により Hg^{2+} が還元される場合や風や水流等により水が攪乱され動的状態にある場合により、生じた Hg^0 の大気中への気散性が大きく異なることが示唆された。

3. 2 クロレラの Hg^{2+} 還元気化に及ぼす pH の影響

次に、クロレラによる Hg^{2+} の還元気化に及ぼす pH の影響について Cl^- 濃度を変化させて検討した。実験は (a) Cl^- 無添加系、(b) 2mM 添加系、(c) 海水中の Cl^- 濃度に相当する0.6M添加系の3系で、 HNO_3 または KOH により pH を調整した22mM リン酸カリウム緩衝液中で行った (Fig. 4)。 Hg^{2+} と Cl^- との間に形成される錯体種の存在比は pH の影響を強く受ける。 Cl^- 無添加系や0.6M Cl^- 添加系では、pH4.0-9.0の範囲での主錯体種はそれぞれ $[\text{Hg}(\text{OH})_2]^0$ 及び $[\text{HgCl}_4]^{2-}$ である。一方、2mM Cl^- 添加の条件においては、pH6.0以下では $[\text{HgCl}_2]^0$ 錯体が約98%を占めるが、pH6.0以上では $[\text{HgCl}_2]^0$ の存在比が減少していき、pH8.0以上ではほぼ全てが $[\text{Hg}(\text{OH})_2]^0$ として存在する。

Fig. 4 Effect of pH on the volatilization of Hg^0 by our *Chlorella* sp. isolate in the light

Cl^- 無添加系 (Fig. 4 (a)) では pH2.0~4.0までは24時間後でも5.9~8.2 $\mu\text{mol/g-cells}$ 程度の還元気化量に留まったが、pH4.0~6.0の範囲で増加し、pH6.0以上では27.0~28.2 $\mu\text{mol/g-cells}$ と同程度であった。

一方、2mM Cl^- 添加系 (Fig. 4 (b)) では、pH2.0では12時間の気化量は16.4 $\mu\text{mol/g-cells}$ に留まったが、pH3.0~6.0では30.3~34.0 $\mu\text{mol/g-cells}$ とほぼ同程度の気化量を示した。この pH 域では、1時間までの12時間までの気化量の73~85%を気化した、pH6.0を超すと1時間までの気化量が大きく低下した。これは、低 pH 域では $[\text{HgCl}_2]^0$ 錯体が主化学種のため、クロレラ細胞内へ容易に透過するが、pH6.0以上では $[\text{HgCl}_2]^0$ に代り、 $[\text{Hg}(\text{OH})_2]^0$ の存在比が増加するために気化量が低下したものと考えられた。

0.6M Cl^- 添加系 (Fig. 4 (c)) の場合、pH6.0以下では1時間まではほとんど気化が見られず、pH8.0~9.0という微アルカリ条件で気化しやすかった。

海水の pH が概ね7.5~8.5の範囲にある¹⁰⁾ことから、 $[\text{HgCl}_4]^{2-}$ が主化学種として存在する海水においては比較的 Hg^{2+} が還元気化されやすい条件であることが示された。

以上のように、クロレラが生育できる pH 領域において、 Hg^{2+} の還元気化は Cl^- 濃度の影響を強く受けた。

3. 3 クロレラの Hg^{2+} 還元気化に及ぼす温度の影響

Hg^{2+} 還元気化に及ぼす温度の影響を検討するため、冷却水循環装置 (東京理化器械㈱製, CTP-201) を用いて恒温槽の水温を15~45℃に変化させ、 Cl^- 無添加系で実

Fig. 5 Effect of temperature on the volatilization of Hg^0 by our *Chlorella* sp. isolate in the absence of Cl^-

験を行った。25℃と比較して、15℃においては気化速度が大きく遅延し、35℃では若干増加した (Fig. 5(a))。また、Fig. 5(b)に示したように、 Hg^{2+} 還元気化の最適温度は30~35℃にあり、24時間までの気化量は15~35℃において28.2~33.5 $\mu\text{mol/g-cells}$ とほぼ同程度であった。しかし、40~45℃の高温域では21.3~22.3 $\mu\text{mol/g-cells}$ と若干低下した。

この温度範囲でのクロレラの比増殖速度及び酸素発生速度を測定した (Fig. 6(a))。いずれも35℃が最適条件であるとともに、両者が密接に関係していることが示された。そして、3時間までの Hg^{2+} の還元気化量は酸素

Fig. 6 Effects of temperature on the specific growth rate and oxygen generation rate of our *Chlorella* sp. isolate (a) and relationship between oxygen generation rate and amount of volatilized Hg^0 until 3h (b)

発生速度とよく対応していた ($y=3.85x-0.087$; y : 3時間までの還元気化量 ($\mu\text{mol/g-cells}$); x : 酸素発生速度 ($\text{mg-O/g-cells} \cdot \text{min}$)) (Fig. 6(b))。また, Hg^{2+} の還元気化はクロレラの増殖が認められない45℃という高温条件でも見られたが, この場合では直線関係から大きくずれていた。

以上のように, クロレラによる Hg^{2+} 還元気化は光照射の影響を強く受け, 光合成活性と密接に関係していることが明らかにされた。

3. 4 他の種のクロレラによる Hg^{2+} 還元気化

これまでの検討は宇都宮大学工学部排水処理施設から単離した, 種を同定していない *Chlorella* sp. を用いて行ってきた。そこで, 同様な水銀気化が他の種のクロレラでも見られるかについて検討を加えた。ここでは, *Chlorella* sp. 分離株の増殖に用いているグリシン培地で増殖した *C. sorokiniana* IAM C-212, *C. vulgaris* IAM C-106, *C. fusca* var. *vacuolata* IAM C-105, *C. kessleri* IAM C-208の4種を用い, Cl^- 無添加系及び $[\text{HgCl}_2]^0$ 生成系の2条件で実験を行った (Fig. 7)。 Cl^- 無添加系では, *C. sorokiniana*, *C. vulgaris*が我々の *C. sp.* 分離株と同様に23.0~28.9 $\mu\text{mol/g-cells}$ とよく Hg^{2+} を還元気化したのに対して, *C. fusca* var. *vacuolata*, *C. kessleri*の2種は9.2~11.9 $\mu\text{mol/g-cells}$ と低い気化量を示した。 $[\text{HgCl}_2]^0$ 生成系でも, *C. fusca* var. *vacuolata*, *C. kessleri*の2種はそれぞれ18.9~22.2 $\mu\text{mol/g-cells}$ と, 他の種の29.8~34.6 $\mu\text{mol/g-cells}$ と比較して還元気化量が小さかった。また,

いずれの種でも, $[\text{HgCl}_2]^0$ 生成系では, Cl^- 無添加系と比較して還元気化量が大きかった。

また, *C. kessleri*を用い, pH6.0において添加 Cl^- 濃度を変化させ, 明条件下での Hg^{2+} 還元気化量を測定した。Fig. 8には比較のため *C. sp.* 分離株の結果も共に示した。*C. sp.* 分離株と同様に, *C. kessleri*においても無電荷錯体 $[\text{HgCl}_2]^0$ の存在比が高い添加 Cl^- 濃度範囲で還元気化量が増加した。さらに, 前述した pH の影響について, *C. sorokiniana*を用いて検討した (Fig. 9)。この場合にも, Fig. 4の *C. sp.* 分離株と類似した還元気化パターンが見られた。

以上のことから, Hg^{2+} の Hg^0 への還元気化はクロレラ

Fig. 8 Volatilization of Hg^0 at various Cl^- concentrations by our *Chlorella* sp. isolate (a) and *C. kessleri* (b) in the light

Fig. 7 Comparison of volatilization of Hg^0 by different *Chlorella* spp. in the light

- : Our *C. sp.* isolate;
- △: *C. sorokiniana*;
- : *C. vulgaris*;
- ◇: *C. fusca* var. *vacuolata*;
- ▽: *C. kessleri*

Fig. 9 Volatilization of Hg^0 at various pHs by *C. sorokiniana* in the light

の種類によらず進行すること、 Hg^{2+} 錯体種による気化のしやすさについても同様であるという結果を得た。

要 約

Hg^{2+} のクロレラによる還元気化が実際の環境条件でどのように起こるかについて、曝気または通気、攪拌、pH、温度等の環境条件を変化させて検討を行った結果、以下の知見を得た。

(1)空気曝気という好気性条件下で気化実験を行ったところ、窒素ガス曝気下と比較して初期の還元気化が遅延したが、最終的な還元気化量に大きな違いは見られなかった。

(2)窒素ガスによる曝気・攪拌条件を通気・攪拌条件に変化させた場合、初期の還元気化が遅延したが、最終的な気化量に差は見られなかった。しかし、攪拌なしの静置条件で通気した場合には約50%程度の還元気化量に低下した。

(3)pH6.0-9.0で Hg^{2+} 還元気化はよく進行したが、 Cl^- との間に形成される Hg^{2+} 錯体種によって気化速度は大きく異なった。

(4)水温15-45℃の範囲で Hg^{2+} 還元気化が認められ、このときの還元気化速度はクロレラの酸素発生速度とよく対応していた。

(5) Hg^{2+} の還元気化速度はクロレラの種類により異なったが、*C. sorokiniana*, *C. vulgaris*, *C. fusca* var. *vacuolata*, *C. kessleri*においても、 $[\text{HgCl}_2]^0$ 錯体が主化学種となる条件では還元気化が急速化された。

以上のことから、 Hg^{2+} 還元気化は広くクロレラによって進行すること、その気化量は風や水流などのほか、塩化物イオン濃度等の配位子の有無によっても大きく影響されることを明らかにした。

文 献

- 1) 藤井正美：地圏、水圏および気圏中の水銀の分布，pp97-141, 「水銀」，喜多村正次他共著，講談社，東京（1976）
- 2) 日本化学会編：用途とその変遷，pp111-121, 「水銀」，丸善，東京（1977）
- 3) Chen Jianhua, Chen Letian, Lin Yuhuan and Shi Wei: Overview on the environmental analysis of mercury in China. *Intern. J. Environ. Anal. Chem.*, **73**, 153-169(1999)
- 4) Robinson, J. B. and Tuovinen O.H.: Mechanisms of microbial resistance and detoxification of mercury and organomercury compounds: Physiological, biochemical, and genetic analyses. *Microbiol. Rev.*, **48**, 95-124(1984)
- 5) 山本 智，柿井一男，荷方稔之，栗山光央，白樫高史：クロレラによる水銀還元気化に及ぼす化学種と光照射の影響，*生物工学*，**77**，213-218（1999）
- 6) 山本 智，柿井一男，荷方稔之，白樫高史：クロレラによる Hg^{2+} 還元気化：光と Hg^{2+} 化学種の影響，*環境化学*，**9**，947-953（1999）
- 7) 栗山光央，吉沢 満，白樫高史，柿井一男：藻類の発生する沈殿池における除去特性—実験排水処理施設の機能と処理特性—，*水質汚濁研究*，**4**，257-265（1981）
- 8) 栗山光央，白樫高史，柿井一男：クロレラによる水銀気化反応，*醗酵工学*，**63**，153-160（1985）
- 9) 白樫高史，山口清一，柿井一男，栗山光央：水銀（Ⅱ）イオンのクロレラの増殖に及ぼす影響—特に，ブロマイドイオン，チオシアン酸イオン存在下における水銀の毒性—，*醗酵工学*，**68**，361-366（1990）
- 10) 大竹千代子編：海水の水質分析例，pp91-93, 「日本環境図譜」，共立出版，東京（1978）