

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 18 日現在

機関番号：32689

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2013

課題番号：23656334

研究課題名(和文) バイオフィenton法に関する研究

研究課題名(英文) Study on Bio-Fenton process

研究代表者

榊原 豊 (SAKAKIBARA, YUTAKA)

早稲田大学・理工学術院・教授

研究者番号：80143204

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円、(間接経費) 900,000円

研究成果の概要(和文)：人工湿地等に生息する水生植物を対象として、細胞内で生成される過酸化水素と鉄化合物を反応させ、用排水中の難分解性汚染物質を分解させる新しい水処理技術(バイオフィenton法)を提案し、PCP等の汚染物質の回分および半連続処理実験から、その可能性と有効性を示した。また、熱帯植物の過酸化水素含有量は温帯植物より高く、熱帯域の人工湿地等への適用が合理的であると考えられた。ここで、バイオフィenton反応は用いる鉄化合物により影響され、磁鉄鉱などの微粒子を用いれば植物に対する影響が低減されること、また、適切な鉄化合物をスクリーニングするには蛍光試薬を用いた分析法が有効と考えられた。

研究成果の概要(英文)：A biological Fenton (Bio-Fenton) process using iron compounds and aquatic plants in constructed wetlands was proposed to decompose refractory and toxic pollutants in water and wastewater. Batch and semi-continuous experimental results demonstrated that pollutants such as endocrine disrupting compounds (EDCs), pentachlorophenol (PCP) and dye could be decomposed by Bio-Fenton process. Some tropical plants possess higher endogenous hydrogen peroxide (H₂O₂) in comparison with temperate plants; therefore, the application of Bio-Fenton process may be more preferable in tropical than temperate regions. In addition, Bio-Fenton process was affected by iron compounds, where fine particles of magnetite were a possible iron compound with smaller stress to aquatic plants. Moreover, a procedure to identify Bio-Fenton reaction with fluorescent reagent is effective in screening appropriate iron compounds.

研究分野：工学

科研費の分科・細目：土木工学・土木環境システム

キーワード：バイオフィenton法 先進人工湿地法 高度水処理技術 促進酸化処理 フェントン反応 難分解性物質 有害物質 熱帯地域

1. 研究開始当初の背景

人類の水消費量は、地球全体の水循環量に比べて無視できないレベルに達しており、世界各地で水資源の不足、水質汚濁、衛生状態の劣化等が生じている。このような問題は人口問題や地球温暖化問題などにより今後更に深刻化する可能性が高い。途上国の中には、このような水に関わる問題が社会経済の発展に大きく影響を及ぼしていることも指摘されている。このような問題を解決する方法として、都市や地域から発生する排水を高度に処理し、循環利用するための革新的な要素技術やプロセスの開発が必要とされている。

2. 研究の目的

人工湿地等に生息する水生植物を対象として、細胞内で産生される過酸化水素(H₂O₂)と鉄化合物を反応させ、用排水中の難分解性汚染物質を分解させる新しい水処理技術(バイオフィenton法)を提案し、その可能性および処理能力に関する基礎資料を得る。これを達成するために、難分解性有害物質の回分および半連続処理実験を行い、浄化性能に及ぼす主要因子、操作条件および浄化能力等を明らかにする。また、生成するOHラジカルの検出および生成箇所等の観察を行い、バイオフィentonプロセスの反応メカニズムに関する基礎資料を得る。さらに、実際の人工湿地等への適用方法について、植物および鉄化合物のスクリーニング法を開発する。

3. 研究の方法

人工湿地や湖沼等に生息する沈水植物、抽水植物、浮遊植物を連続培養し、難分解性物質の分解実験を異なる条件下で行う。ここで、難分解性物質としてペンタクロロフェノール(PCP)等の有機塩素化合物、医薬品、環境ホルモン等を対象とする。また、浄化能力の測定に合わせて、植物組織と鉄化合物との反応過程を電子スピン共鳴(ESR)装置を用いて解析し、OHラジカル生成の有無を検証する。また、蛍光分析法により植物組織内のOHラジカル生成場所を特定する。これらの結果から、バイオフィentonプロセスの反応メカニズムを解明する。さらに、人工湿地にバイオフィenton反応を適用して浄化性能を飛躍的に向上させたための植物および鉄化合物のスクリーニング法を提案する。

本研究で対象とした微量有害物質(環境ホルモン類、PCP)は環境省内分泌攪乱化学物質調査暫定マニュアル(1998)を参考にしてGC/MS(島津QP5050A)およびECD(Agilent 6890)を用いて分析した。また、オレンジの測定は分光光度計(島津UV-160A)を用いた。植物体内の過酸化水素濃度の分析は、既往研究(Okuda et al. 1991; Uchida et al. 2002)に従った。また、ESR測定にはパルス電子スピン共鳴装置(日本電子JES-TE200)を用い、スピントラップ剤として5-(diethoxyphosphoryl)-5-methyl-1-pyrroli

ne N-oxide (DEPMPPO)を用いた。さらに、蛍光分析には活性酸素検出用蛍光試薬(Aminophenyl Fluorescein (APF))と蛍光顕微鏡(オリンパスBX-60)を用いた。

4. 研究成果

(1) 図1のウキクサ(*Sprodelia polyrhiza*), アマゾンフロッグピッド(*Limnobium laevigatum*), マツモ(*Ceratophyllum demersum*), アナカリス(*Egeria densa*)内の過酸化水素濃度を測定すると0.1~0.6 mmol/kg-F.W. (表1)存在することがわかった。これらの植物は環境ホルモン類(ビスフェノールA, ジクロロフェノール, ノニルフェノール, オクチルフェノール)、天然由来のエストロゲン類(17βエストラジオール, エストロン)および合成エストロゲン(17αエチニルエストラジオール)を除去できる。

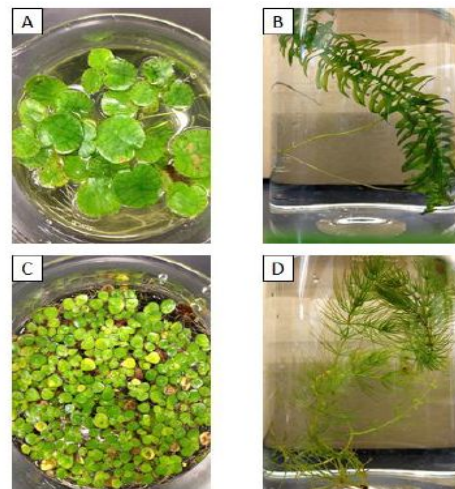


図1 供試植物の一例 (A: アマゾン、B: アナカリス、C: ウキクサ、D: マツモ)

表1 植物体内 H₂O₂ 濃度および PO 活性

水生植物	含水量 (%)	PO (U/g-F.W.)	H ₂ O ₂ (nmol/g-F.W.)
アマゾン	94.8	25.34	611
アナカリス	-	-	115
ウキクサ	93.6	11.98	301
マツモ	94.3	165.8	99.1

(2) 図2はDEPMPPOを用いたESR測定結果の一例である。図中のnがフェントン試薬による結果であり、oが鉄添加条件、pが鉄無添加条件である。図中の点線はOHラジカル生成に特有のピーク(Claudine et al., 1995)である。図に示すように、50μM程度のFe²⁺の存在により植物内の過酸化水素からOHラジカルが生成されることがわかる。なお、鉄が存在しないとOHラジカルは生成されない。植物体内のH₂O₂濃度(表1)はフェントン反応で一般的に用いられている濃度範囲(数mM

~数 M 程度)に比べて低いが、OH ラジカルは生成可能である。また、H₂O₂ 濃度は排水中や環境中の環境ホルモンや医薬品などの濃度レベルと比べて概ね 5 桁程度高い。

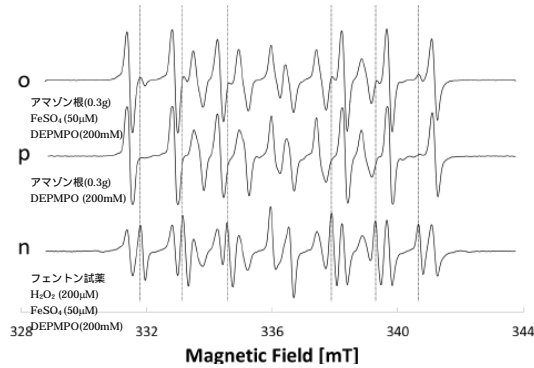
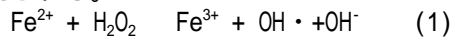


図2 DEPMPO を用いた ESR 分析結果

(3) 図3はウキクサ (*S. polyrrhia*) およびアオウキクサ (*L. aoukikusa*) を用い、異なる鉄存在下で PCP の回分処理実験 (処理時間 48 h) を行った結果である。植物が存在しない場合 (Control) は PCP 濃度に変化がなかったが、植物および Fe²⁺ 存在下では約 70~100% 除去された。植物体内の H₂O₂ 濃度は鉄濃度の増加により急激に減少したが、5mM 以上では減少量はほぼ一定になった。また、図5に初期 PCP 濃度を約 5mg/L とした実験結果を示す。鉄添加により PCP 濃度が大きく減少し、同時に塩化物イオン濃度が上昇した。実験中期までに除去された PCP と生成された塩化物イオンはモル数でほぼ 1:6 の関係にあり、以下に示すように PCP が完全に分解されていると考えられる。



(4) 図5は図3,4に示した条件下の植物観察結果である。Fe²⁺濃度が数 mM 以上ではウキク

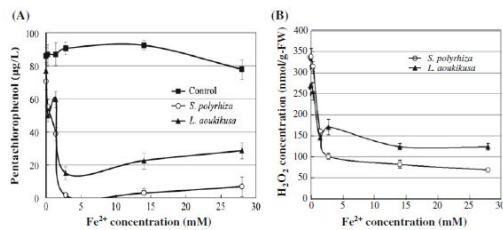


図3 PCP の回分実験 (鉄濃度の影響)

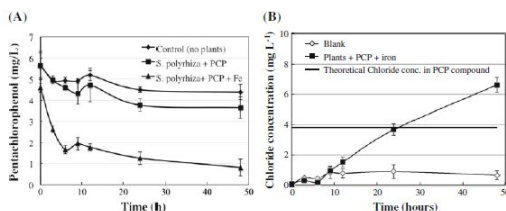


図4 PCP/Cl⁻の濃度変化(Fe²⁺=2.8mM)

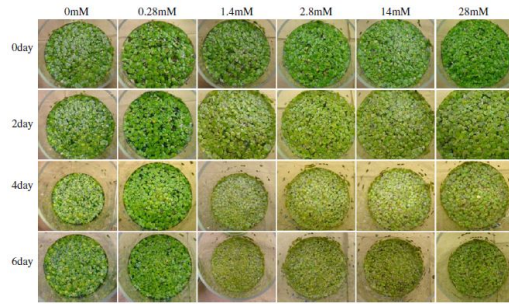


図5 異なる Fe²⁺ 添加条件下の PCP 処理における植物 (*S. polyrrhiza*) の様子

サの葉が脱色し、一部黒く枯れる傾向が見られた。

(5) 図6はオレンジをモデル汚染物質としてウキクサ (*S. polyrrhiza*) による半連続式の脱色実験を行った結果である。また、図7に植物の様子を示した。図6より、初期 Fe²⁺ 濃度により脱色量が異なった。Fe²⁺ 濃度が 5mg/L 以上では 1 カ月程度で枯れてしまい半連続処理ができなくなった。一方、鉄無添加条件では脱色量は大きかったが、実験終了時には植物量が大きく減少した。最適な鉄添加量は回分実験より低濃度側にあり、これは OH ラジカルの生成により、植物本体が影響を受けていることによると推察される。

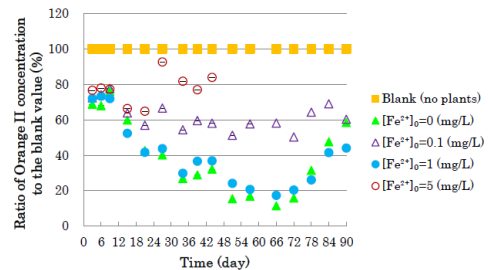


図6 オレンジの半連続実験結果 (植物なしのブランク値より補正)

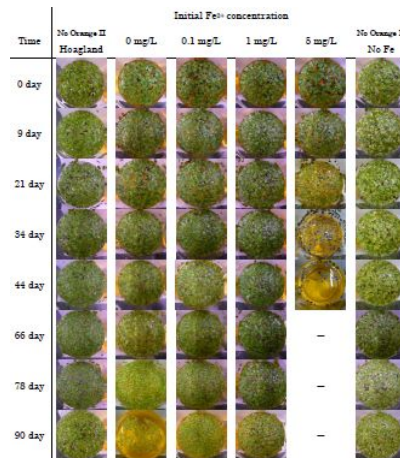


図7 半連続処理中の植物の様子

(6) 図 8 に PCP の半連続処理結果を示す。横軸はサイクル数で反応時間 3 日のサイクルを 31 回継続した。下段の図は鉄無添加条件と添加条件 ($\text{Fe}^{2+}=1\text{mg/L}$) の植物 (*L. laevigatum*) の湿潤重量である。流入濃度が $100\mu\text{g/L}$ の条件では植物は殆ど増殖しなかったが、流入濃度を $50\mu\text{g/L}$ にすると増殖を開始した。処理水中の PCP 濃度は多くが流入濃度より低下したが、その減少量はあまり大きくなかった。これは植物の増殖阻害を回避するため、 Fe^{2+} 濃度を低く設定したことによると考えられる。

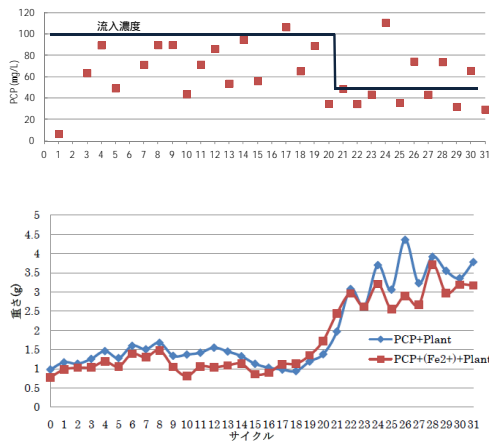


図 8 PCP の半連続処理結果

(7) 図 9 は温帯域および熱帯域の水生植物の H_2O_2 含量を比較したものである。熱帯域の植物はその含有量に大きな幅があるが、温帯域のそれに比べて 1 桁程度高い植物が存在する。したがって、これらの植物を上手く活用することができればバイオフィenton反応をより効率的に安定して進行させることができると考えられる。また、高 H_2O_2 含有植物はベチパー (*Vetiveria zizanioides*) やガマ (*Typha latifolia*) であった。さらに、これらの植物を植栽した人工湿地による実排水パイロット試験から、通常の一般的水質項目 (BOD, SS, 大腸菌など) の他に、供試排水中の医薬品 (抗生物質のアモキシシリン、スルファメトラゾール、テトラサイクリン) が高効率で除去されることがわかった。

(8) 人工湿地内で鉄化合物を植物に供給するための鉄/ブロック担体を作製して、鉄イオンの溶出速度について検討した。その結果、溶出速度は担体内の細孔率および pH に大きく影響され、特に担体内の pH を弱酸性に保つことが安定した鉄供給に重要であることがわかった。

(9) 植物体内の過酸化水素濃度は、16 時間/8 時間の明暗条件下において安定して維持されること、また暗条件下においても体内に 10 日間程度維持され、夜間や日射条件の変化に大きく影響されないことがわかった。

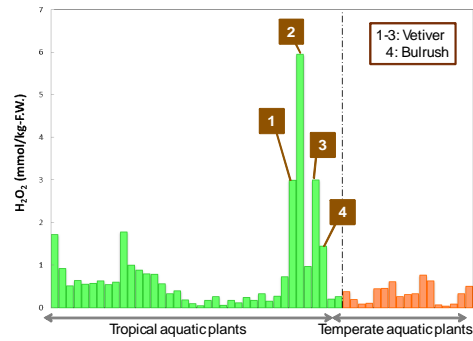
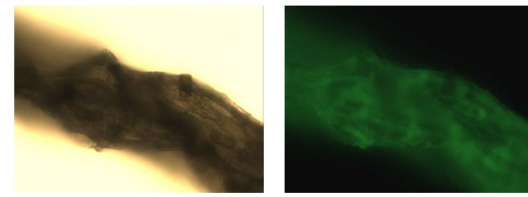


図 9 H_2O_2 含有量の比較

(10) 図 10 は OH ラジカル検出用の蛍光試薬 (APF) を用いて異なる鉄化合物を添加した場合の様子を比較したものである。(A) は Fe^{2+} 添加の場合、(B) は磁鉄鉱微粒子を用いた場合である。図に示すように蛍光が両ケースとも観察された。 Fe^{2+} の場合、蛍光は主として植物体内から発生している。つまり、フェントン反応は植物体内で生じ、体内の H_2O_2 が OH ラジカルに変換されている。このことは、見方を変えると、植物細胞が直接損傷している可能性を示している。半連続試験より高鉄濃度条件にすると植物が枯れてしまったのはこのことによるとと思われる。一方、(B) に示すように、鉄微粒子を用いると、蛍光は植物体外から発している。すなわち、鉄微粒子は植物表面に吸着し、そこに体内の H_2O_2 が供給されフェントン様反応あるいはフェントン反応が連続的に進行していることを示している。本研究の蛍光試薬を用いた分析法は、最適な鉄化合物や植物のスクリーニング法としても利用できると思われる。

(A) $10\text{ mg/L Fe}^{2+} + 10\ \mu\text{M APF} + \text{Duckweed (Lemna aotikikusa)}$



(B) $10\text{ mg/L Nanoparticle} + 10\ \mu\text{M APF} + \text{Amazon (Limnolobium laevigatum)}$

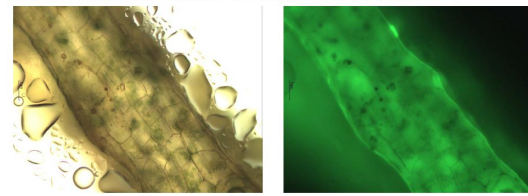


図 10 フェントン反応の蛍光観察結果

(10) 以上より、水生植物内の過酸化水素を利用して鉄化合物の存在下でフェントン反応を進行させることができることがわかった。最適な植物は過酸化水素を高濃度で含有するものが有利であり、温帯植物より熱帯植物が優れている。バイオフィenton反応は用

いる鉄化合物により影響され、磁鉄鉱などの微粒子を用いれば植物に対する影響が低減されると考えられる。また、現場でより優れた鉄化合物をスクリーニングする際には本研究の蛍光試薬を用いた分析法が有効と考えられる。

【参考文献】

- 1) Uchida A., Jagendorf A. T., Hibino T., Takabe T., and Takabe T. (2002), Effects of hydrogen peroxide and nitric oxide on both salt and heat stress tolerance in rice., *Plant Science*, **163**, 515-523.
- 2) Okuda T., Matsuda Y., Yamanaka A., and Sagisaka S. (1991) Abrupt increase in the level of hydrogen peroxide in leaves of winter wheat is caused by cold treatment, *Plant Physiol* **97**(3), 1265-1267.
- 3) 環境庁水質保全局(1998)、外因性内分泌攪乱化学物質調査暫定マニュアル
- 4) Claudine F. et al. (1995) 5-(diethoxyphosphoryl)-5-methyl-1-pyrrolo ne N-oxide: A new efficient phosphorylated nitrene for the in vitro and in vivo spin trapping of oxygen-centered radicals, *J. Med. Chem.* **38**, 258-265.

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計4件)

A. R. Reis, K. Tabei, and Y. Sakakibara, Oxidation mechanism and overall removal rates of endocrine disrupting chemicals by aquatic plants, *Journal of Hazardous Materials*, 査読有, Vol. 265, 2014, 79-88

DOI:10.1016/j.jhazmat.2013.11.042

A. R. dos Reis and Y. Sakakibara, Enzymatic treatment of endocrine disrupting chemicals in aquatic plants and relations to biological Fenton reaction, *Water Science and Technology*, 査読有, Vol. 66, No. 4, 2013, 775-782
<http://www.iwaponline.com/wst/default.htm>

A. R. dos Reis Y. Kyuma and Y. Sakakibara, Biological Fenton's oxidation of pentachlorophenol by aquatic plants, *Bull Environ Contam Toxicol*, 査読有, Vol. 91, 2013, 718-723

DOI: 10.1007/s00128-013-1106-4

稲垣嘉彦、藤田史郎、A. R. dos Reis, 鈴木詩麻、榊原 豊、水生植物のエストロゲン類浄化能力に関する基礎的研究、*土木学会論文集 G(環境)*、査読有、Vol. 68, No. 7, 2012, 77-85

<http://committees.jsce.or.jp/eec/>

〔学会発表〕(計13件)

S. Suzuki et al., Hydrogen peroxide in tropical and temperate aquatic plants, The 7th International Conference on Environmental Science and Technology, May 6-9, 2014, Houston, USA

鈴木詩麻ら、水生植物の過酸化水素濃度に関する研究、第48回日本水環境学会年会、2014年3月17日~19日、仙台

L. Cheng et al., A Fe-cycle for enhancing the function and performance of constructed wetland, 第48回日本水環境学会年会、2014年3月17日~19日、仙台

稲垣嘉彦ら、バイオフェントン法における鉄供給に関する研究、第68回土木学会年次学術講演会、2013年9月4日~6日、津田沼、千葉

鈴木詩麻ら、水生植物の環境汚染物質除去における物質移動速度に関する研究、第68回土木学会年次学術講演会、2013年9月4日~6日、津田沼、千葉

A. R. dos Reis et al., 水生植物の汚染物質除去における物質移動速度に関する研究、第47回日本水環境学会年会、2013年3月11日~13日、大阪

佐藤愛澄ら、バイオフェントンプロセスにおける鉄供給法に関する基礎的研究、第47回日本水環境学会年会、2013年3月11日~13日、大阪

Y. Kyuma et al., Operating condition of bio-Fenton process for treatments of Orange , 18th International Conference on Advanced Oxidation Technology (AOTs-18), Nov. 12-15, 2012, Jacksonville, Florida, USA

A. R. dos Reis et al., Biological Fenton's degradation of chlorinated endocrine disrupting chemicals by aquatic plants, The 6th International Conference on Environmental Science and Technology, June 25-29, 2012, Houston, Texas, USA

S. Nagahashi et al., Electron spin resonance analysis of bio-Fenton process, The 6th International Conference on Environmental Science and Technology, June 25-29, 2012, Houston, Texas, USA

Y. Inagaki et al., A biological Fenton reaction for the complete decomposition of chlorinated compounds, International Conference on remediation of chlorinated and recalcitrant compounds, May 21-24, 2012, Monterey, California, USA

久間有香子ら、バイオフェントン反応の操作条件に関する基礎的検討、第46回日本水環境学会年会、2012年3月14日、東京

永橋洋一、電子スピン共鳴法(ESR)を用いたバイオフェントン反応の検討、第46回日本水環境学会年会、2012年3月14日、東京

〔図書〕(計0件)

〔その他〕ホームページ：
<http://www.waseda.jp/sem-sakaki01/sakakibara1-top.htm>

6．研究組織

(1)研究代表者

榊原 豊 (SAKAKIBARA, Yutaka)
早稲田大学・理工学術院・教授
研究者番号：80143204

(2)研究分担者 なし

(3)連携研究者 なし