

機関番号：11201

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23360230

研究課題名(和文) 亜ヒ酸酸化細菌を用いた地下水からの新規ヒ素除去装置の開発

研究課題名(英文) Development of innovative arsenic removal apparatus from groundwater using arsenite oxidizing bacteria

研究代表者

海田 輝之 (UMITA, Teruyuki)

岩手大学・工学部・教授

研究者番号：30117072

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,200,000円、(間接経費) 4,260,000円

研究成果の概要(和文)：活性汚泥から亜ヒ酸酸化能を有する細菌を無機培地を用いて集積培養し、16S rRNA遺伝子解析より、亜ヒ酸の酸化に関与する細菌は、*Rhizobium* sp.であることが示唆された。また、細菌群の亜ヒ酸の酸化に及ぼすDO、pH、水温による影響を明らかにした。次に、集積培養したスポンジ担体に固定化し、無曝気条件下でAs(III)とFe(II)を流入させ、AsとFeの連続酸化とFeによるAs共沈除去について検討した。その結果、滞留時間2時間で流入Fe(II)濃度が25 mg/Lの場合、平均95.1%のAsを除去することができ、水道水質基準値付近まで除去することができた。

研究成果の概要(英文)：The health impairment caused by ingestion of the arsenic in groundwater is serious especially in Asian areas. In order to remove arsenic in groundwater by coagulation or adsorption, arsenite in groundwater needs to be oxidized to arsenate. In this research, arsenite-oxidizing bacteria are enriched from activated sludge, then 16S rRNA gene analysis was conducted. It was suggested that *Rhizobium* sp. is responsible for arsenite oxidation. The optimum conditions for arsenite oxidation by the bacteria were pH 7 and 30 degrees Celsius. For developing an innovative arsenic removal apparatus without aeration, oxidizer, and flocculant, a Down-Flow Hanging Sponge reactor with fixed arsenite-oxidizing bacteria was examined. As a result, when the inflow concentrations of arsenite and ferrous iron were 0.5 mg/L and 25 mg/L, respectively, the average arsenic removal efficiency was about 95%. This efficiency was correspondent to the water quality standard for drinking water value of 0.01 mg/L.

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：ヒ素除去 亜ヒ酸酸化細菌 地下水 DHSリアクター

1. 研究開始当初の背景

地下水のヒ素汚染は、特にアジアで非常に深刻であり、報告されているだけでも5000万以上の人々が0.01mg/L以上のヒ素を含有する飲料水を摂取している。地下水中のヒ素は主に亜ヒ酸の形態で存在している。そのため、既存の処理技術である鉄やアルミニウムの加水分解生成物との共沈を用いた凝集沈殿処理では、亜ヒ酸の除去効率が低いため、酸化剤を用いて亜ヒ酸をヒ酸に酸化後に行われており、安価で効率的な酸化手法の開発が待ち望まれている。

2. 研究の目的

本研究の目的は、地下水のように有機物濃度が低く、亜ヒ酸を高濃度に含有する原水の浄化に化学合成独立栄養の亜ヒ酸酸化細菌を用いて、亜ヒ酸からヒ酸への酸化を生物学的に行うための手法を開発し、ヒ素の摂取による健康に対するリスクを画期的に低減し、世界に貢献できる技術を提案することである。

3. 研究の方法

(1) ヒ素の分析

試料中のAsの形態別分析は、カラムとしてGelpack GL-IC-A15 (日立化成)を用いた高速液体クロマトグラフ(島津, SLC-10Avpシステム) - 誘導結合プラズマ質量分析装置(Thermo, iCAP Qc)により行った。

(2) 亜ヒ酸酸化能を有する細菌の集積培養

亜ヒ酸酸化能を有する細菌の集積培養を行うため、比較的As濃度が高い下水を受容する秋保温泉浄化センターの酸化槽から活性汚泥を採取した。この活性汚泥をAs(III)を100 mg/L含むWeegerらの培地(有機炭素源である乳酸ナトリウムを除いた)に植種し、継代培養を行った。

(3) 集積培養した細菌群の16S rRNA遺伝子解析

培養液中の微生物をフィルター上に捕捉し、SDS処理, Bead Beater処理を行った。抽出したDNAは50 μLのTE (10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 1 mM EDTA) に溶解した。抽出DNAをテンプレートにBact9f (5' -GAG TTT GAT CMT GGC TCA G-3') とBact1492r (5' -ACG GYT ACC TTG TTA GGA CTT-3') のプライマーペアを使って細菌の16S rRNA遺伝子をPCR増幅した。取得した16S rRNA遺伝子は、3130 Genetic Analyzerによって塩基配列を決定し、NCBIのBLASTを利用して近縁種の探索を行った。

(4) 集積培養した亜ヒ酸酸化能を有する細菌の培養条件による亜ヒ酸酸化特性

回分実験により、As(III), DO, pH (4~10) 及び水温 (15~30℃) の影響について検討した。

(5) 亜ヒ酸連続除去実験

図-1に示すDHS(Down-Flow Hanging Spong)リアクターを用いて、亜ヒ酸の連続除去実験を行った。流入As(III)濃度は0.5mg/Lとし、流

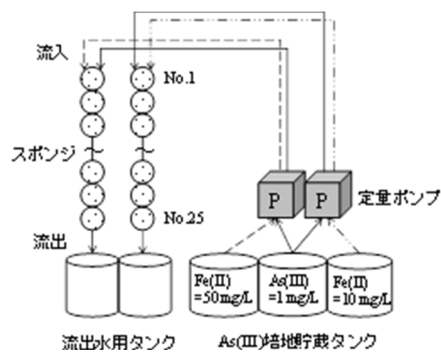


図-1 亜ヒ酸除去装置

入水にFe(II)を5及び25mg/L添加し、反応槽内のスポンジ担体に亜ヒ酸酸化能を有する細菌を固定化し、酸化されたAs(V)がFe(III)に共沈により除去されることを期待した。なお、滞留時間は2時間とし、亜ヒ酸で汚染された多くの地下水中にはFeが含まれていることが確認されている。

4. 研究成果

(1) 集積培養した亜ヒ酸酸化能を有する細菌の特性

図-2に集積培養の結果を示す。継代培養の4回目以降はAs(III)が3日程度でAs(V)に酸化されており、集積培養が十分に行われていることが分かる。本研究では、6回目の継代培養の培養液を回分及び連続培養の植種源として用いた。

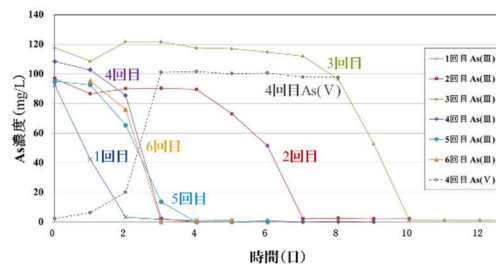


図-2 継代培養におけるAs(III)の経時変化

また、As(III)酸化速度に及ぼす初期As(III)濃度S [mg/L]は、以下のMichaelis-Menten式によって表された。

$$v = \frac{4.7 \times 10^{-12} S}{3.68 + S}$$

ここで、v: 単位時間・単位菌数当りの酸化速度 [mg/min/cell] である。

図-3に①「DOあり・植種なし」、②「DOあり・植種あり」、③「DOなし・植種あり」のAs(III)濃度の経時変化を示す。DOが供給されていたとしても細菌が存在しない条件下ではAs(III)はほとんど酸化せず、逆に、植種して細菌が存在していたとしてもDOが供給されない条件下ではAs(III)は酸化されなかった。したがって、この条件では空気酸化による化学的な亜ヒ酸酸化は起こることはなく、細菌による生物学的酸化であること、また本研究で

集積した細菌は好気性細菌であると判断した。

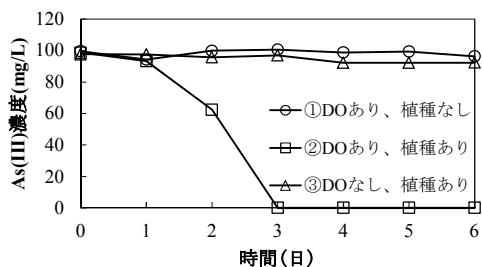


図-3 DOの影響によるAs(III)濃度の経時変化

図-4にpH 4~10までの各条件におけるAs(III)濃度の経時変化を示す。pH 7の場合が最も酸化速度が速く、4日目で98%以上酸化した。次にpH 6の場合で、14日目で99%以上酸化した。pH 5に関しては26日間要して緩やかに酸化し、pH 8に関しては16日間のラグがあったが、その5日後の21日目で98%酸化した。なお、pH 4, 9, 10ではほとんど酸化しなかった。

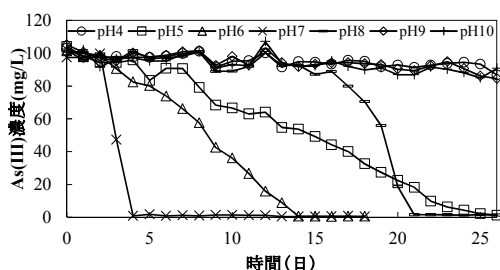


図-4 各 pH における As(III)濃度の経時変化

図-5に水温を変化させた場合のAs(III)濃度の経時変化を示す。水温30℃の場合が最もAs(III)酸化速度が速く、2日目でほぼ100%酸化した。次に水温20, 25℃の場合で、3日目でほぼ100%酸化した。水温15℃の場合では酸化しなかった。以上より、本実験条件では30℃が最適であった。

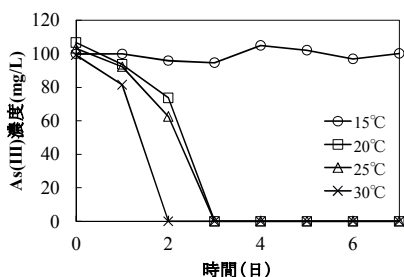


図-5 各水温におけるAs(III)濃度の経時変化

次に、集積培養液から抽出したDNAを基に、16S rRNA遺伝子をPCR増幅し、クローンを取得した。取得クローンは61で、その塩基配列を決定し、複数回検出されたクローンを表-1のようにClone Type 1~8として整理した。61クローンの内、59クローンがこれらのClone Typeに属し、ある限られた種類の細菌が優占化していることが分かった。表中には取得クローン数、全61に対する優占率を示した。また、これらClone Typeの機能を推測するため、NCBIの最近縁種とそれに対する相同性を示

した。Clone Type 7と8以外は、99%以上の極めて高い相同性を示した。これらの細菌のうち、*Rhizobium sp.* のある株 (NT-26) は化学合成独立栄養でAs(III)を酸化することによってエネルギーを獲得すると報告されていることから、培養液中の細菌群の中では、*Rhizobium sp.* が亜硫酸の酸化に関与していると考えられた。

表-1 16S rRNA 遺伝子クローンの解析結果

| Clone Type | 取得クローン数 | 優占率(%) | Close relatives                             | Identity(%) | Accession number |
|------------|---------|--------|---|-------------|------------------|
| 1          | 13      | 21.3   | <i>Pseudomonas putida</i> F1                | 100         | NR 074739        |
| 2          | 12      | 19.7   | <i>Nitrosospira sp.</i> Nsp65               | 99.4        | AY123813         |
| 3          | 9       | 14.8   | <i>Rhizobium sp.</i> p49                    | 99.8        | HQ652582         |
| 4          | 6       | 9.8    | <i>Pseudaminobacter defluvi</i> NBRC 14570  | 99.9        | AB680636         |
| 5          | 6       | 9.8    | <i>Hydrocolea sp.</i> AF-51                 | 99.0        | JF739858         |
| 6          | 5       | 8.2    | <i>Trachelomonas volvocinopsis</i> UTEX1313 | 97.5        | FJ719709         |
| 7          | 5       | 8.2    | Uncultured bacterium clone Ip304            | 94.3        | KC31522          |
| 8          | 3       | 4.9    | <i>Comamonas sp.</i> VT13                   | 100         | JQ433933         |

(2)連続亜硫酸除去実験

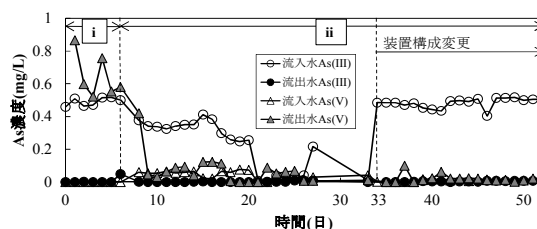


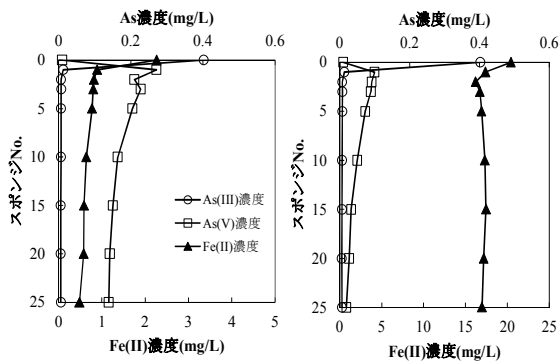
図-6 As濃度の経時変化 (流入水As(III) : 0.5 mg/L, 流入水Fe(II) : 25 mg/L)

図-6に流入As(III)濃度を0.5 mg/L, 流入Fe(II)濃度を25 mg/L, HRT 2hとした場合の流入水と流出水の形態別As濃度の経時変化を例として示す。なお、図中の期間(i)ではFe(II)を添加せず、期間(ii)では添加した。図-6の期間(i)において、流入口から0.5 mg/Lで流入したAs(III)が、流出口ではほぼ0 mg/Lとなっており、一方、流入口ではほとんど検出されなかったAs(V)が、流出口ではAs(III)初期濃度と同程度の値で検出された。このことから、リアクター内に亜硫酸酸化能を有した細菌が固定化され、かつAs(III)の酸化活動が行われていることが確認された。両リアクターで94.3%以上のAs(III)がAs(V)に酸化されていた。図-6の期間(ii)において、リアクター上部からの流入前に培地貯蔵タンク内でAsとFeが共沈してしまったため、流入水のAs(III)濃度が設定濃度0.5 mg/Lよりも低くなっている。しかし、図-1に示すように、AsとFeを独自に流入させるように装置構成変更(33日目以降)後、流入As(III)濃度を一定に保つことができ、最大100%、平均95.1%のAsを除去することができ、Asの水道水質基準値0.01 mg/L付近まで除去することができた。一方、流入Fe(II)濃度が5 mg/Lの場合では経時的に除去率が上がり、42日目以降平均84.2%のAsを除去することができた。

図-7に流入As(III)濃度を0.5 mg/L, 流入Fe(II)濃度を5 mg/L及び25 mg/Lとした場合の連続除去実験最終日の鉛直方向におけるAs濃度及びFe(II)濃度の変化を示す。

両リアクターとも1個目のスポンジでAs(III)の酸化がほぼ完了していることから、リアクター上部に細菌が集中して存在していることが考えられる。Fe(II)濃度については、

流入Fe(II)濃度が5 mg/Lの場合では流入してから0.9~0.5 mg/Lに緩やかに減少したのに対して、流入Fe(II)濃度が25 mg/Lの場合では2個目のスポンジから17 mg/L前後で一定となった。また、実験装置構成変更後において、各リアクターの流出水のFe(III)濃度は、流入Fe(II)濃度が5 mg/Lの場合は平均0.10 mg/L、流入Fe(II)濃度が25 mg/Lの場合は平均1.02 mg/Lといずれも流出Fe(II)濃度に対して非常に低い値であり、流出水中のT-Fe (Fe(II)+Fe(III)) はほぼFe(II)であった。また、リアクター上部でFe(II)濃度が減少していた。このことから、滞留時間2hではリアクター内でのFe(II)からFe(III)への空気酸化は十分ではなく、リアクター上部では鉄酸化能を有する細菌が存在していたと考えられ、今後検討する必要がある。流入Fe(II)濃度が5 mg/Lの場合では25個目のスポンジの地点で0.15 mg/LのAsが残留していたが、流入Fe(II)濃度が25 mg/Lの場合では、25個目のスポンジでAsを水道水質基準値である0.01 mg/L付近まで除去していた。



(a) 流入As(III) : 0.5 mg/L, 流入Fe(II) : 5 mg/L (b) 流入As(III) : 0.5 mg/L, 流入Fe(II) : 25 mg/L

図-7 As及びFeの鉛直分布

図-8は、リアクター内に残留したAsとFe量を示している。As, Fe量ともにスポンジ上部に多く残留しており、流入Fe(II) = 25 mg/Lの場合の方が残留量は多かった。AsとFeは共沈しているの、AsとFeの量は連動していることが分かる。分析を行った各スポンジ内に残留したFe/As比は、流入Fe(II)濃度が5 mg/Lの場合では平均Fe/As = 3.87、流入Fe(II)濃度が25 mg/Lの場合では平均Fe/As = 8.95であった。Asの除去率は前述のように流入Fe(II)濃度に依

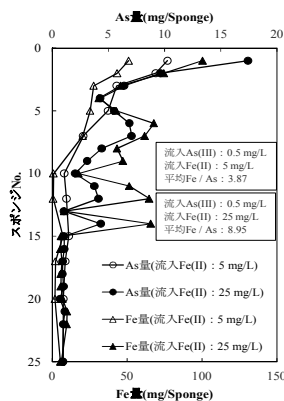


図-8 リアクター内に残留したAsとFe量

存しており、流入As(III)濃度に対する最適流入Fe(II)濃度を今後検討する予定である。

(3)As(III)連続酸化のモデル化とAs(III)濃度の予測

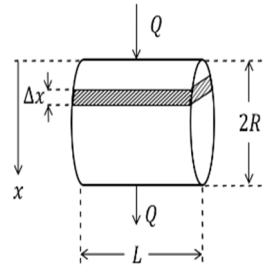


図-9 スポンジ担体のモデル

スポンジ担体内の流れをplug flowとし、図-9に示したように鉛直下方にxをとり、担体の半径をR、担体の長さをLとする。図に示した微小体積要素についての物質収支より、

$$\frac{\partial C}{\partial t} = -\frac{Q}{A} \frac{\partial C}{\partial x} - (-r) \quad (1)$$

ここで、C : As(III)濃度, Q : 流量, A : 断面積, -r : 単位時間・単位体積当たりのAs(III)酸化量である。

定常状態で、As(III)酸化速度が1次反応に従うとして、 $-r = kC$  (k : 速度定数[1/T]) とすると、

$$\frac{Q}{A} \frac{dC}{dx} = -kC \quad (2)$$

$A = 2L\sqrt{2Rx - x^2}$  を代入して式②を解き、ある担体の最上部  $x = 0$  から流入するAs(III)の濃度を  $C_{in}$  とすると、

$$\ln C = \ln C_{in} - \frac{kLR^2\pi}{2Q} + \frac{kL}{Q} \{ R^2 \arcsin\left(\frac{R-x}{R}\right) - (x-R)\sqrt{2Rx - x^2} \}$$

$x = 2R$ , 即ち、担体から流出するAs(III)濃度を  $C_{out}$  とすると、

$$C_{out} = C_{in} \exp\left(-\frac{kLR^2\pi}{Q}\right) \quad (3)$$

式③の  $C_{out}$  の値を直下部の担体の  $C_{in}$  と置くことによって、As(III)の濃度が順次計算できることになる。

本モデルでは、解析解が得られるようにAs(III)酸化速度が1次反応に従うとした。飽和定数  $K_m$  が3.68 mg/Lなので、計算対象としては流入As(III)濃度が低い0.5mg/Lの場合とする。

1次反応の速度定数の値は本研究で得たMichelis-Menten式の値を用いる。また、計算では担体内の細菌数が必要なため、担体内の細菌数が得られているHRT 0.5 hの場合とし、実測値がない場合は両近傍の実測値から内挿し、さらに、各担体内で細菌は均一に分布しているとする。本実験で得られた速度式は細菌が分散状態で得られたものであり、担体内では拡散抵抗を考慮する必要があるため、ここでは式③のexp内に係数  $\eta$  を掛け、実測のAs(III)濃度に合うように定める。図-10に  $\eta = 0.8$  とした場合の計算結果を実測値と合わせて示す。実測値は流入水にAs(III)のみを含む条件で

HRTを0.5hとした場合である。これより中層部において計算値は実測値と比較して若干のずれがあるが、単純化した本モデルでも概ね流下方向のAs(III)濃度の分布を良く表していると考えられる。また、図中の□印は細菌数の分布がHRT0.5 hの場合と同じでHRTを0.25 hとして計算したAs(III)濃度の流下方向の変化を示す。この場合には、流出As(III)濃度は0.1 mg/L程度までしか低下しないことが分る。今後は、 $\eta$  の値の妥当性を検討する必要がある。

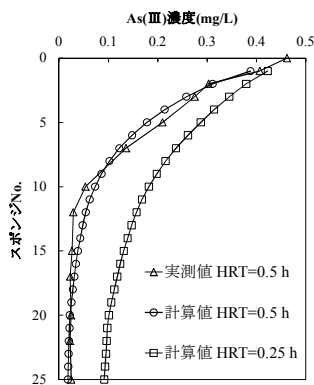


図-10 As濃度の計算及び実測値

#### (4) まとめ

本研究では、亜ヒ酸酸化能を有する細菌を活性汚泥から集積培養し、その特性を明らかにするとともに、この細菌を利用した亜ヒ酸を含有する地下水からの新規ヒ素除去装置の開発に成功した。

#### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 3 件)

- ① 瀬川奈未, 高橋知大, 石川奈緒, 伊藤 歩, 中村寛治, 海田輝之, 活性汚泥から集積培養した亜ヒ酸酸化能を有する細菌を用いた亜ヒ酸の連続酸化, 木学会論文集 G(環境), 査読有, 69, 2013, III-1-III8
- ② Ayumi Ito, Jyun-ichi Miura, Nao Ishikawa, Teruyuki Umita, Biological oxidation of arsenite in synthetic groundwater using immobilized bacteria, Water Research, 査読有, 46, 2012, 4825-4831
- ③ 石川奈緒, 三浦洵一, 伊藤 歩, 海田輝之, 亜ヒ酸酸化細菌を用いたバイオリアクターによる連続的な亜ヒ酸酸化処理に関する研究, 土木学会論文集 G(環境), 査読有, 67, 2011, 417-423

〔学会発表〕(計 5 件)

- ① 菅野健人, 瀬川奈未, 石川奈緒, 伊藤 歩, 海田輝之, DHS リアクターを用いた亜ヒ酸酸化細菌による亜ヒ酸の連続酸化と除去に関する研究, 土木学会東北支部技術研究発表会, 2014.3.8, 八戸工業大学(青

森県)

- ② Segawa Nami, Tohiro Takahashi, Nao Ishikawa, Ito Ayumi, Teruyuki Umita, Continuous oxidation of arsenite by arsenite-oxidizing bacteria with a DHS reactor, Water Engineering Conference, 2013.6.15-16, 東京農工大学(東京都)
- ③ 瀬川奈未, 高橋知大, 石川奈緒, 伊藤 歩, 海田輝之, DHS リアクターを用いた亜ヒ酸酸化細菌による亜ヒ酸の連続酸化, 土木学会東北支部技術研究発表会, 2013.3.9, 東北大学(宮城県)
- ④ 高橋知大, 三浦甲斐, 石川奈緒, 伊藤 歩, 海田輝之, 地下水中のヒ素除去を目的とした亜ヒ酸の生物学的連続酸化に関する研究, 土木学会東北支部技術研究発表会, VII-43, 2012.3.3, 秋田大学(秋田県)
- ⑤ Nao Ishikawa, Ayumi Ito, Teruyuki Umita, Continuous arsenic oxidation treatment using arsenite-oxidizing bacteria in a bioreactor without aeration system, 16th International Symposium on Health-Related Water Microbiology, 2011.9.18-23, Rotorua, New Zealand

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

海田 輝之 (UMITA Teruyuki)  
岩手大学・工学部・教授  
研究者番号：30117072

##### (2) 研究分担者

伊藤 歩 (ITO Ayumi)  
岩手大学・工学研究科・准教授  
研究者番号：90312511

石川 奈緒 (ISHIKAWA Nao)  
岩手大学・工学部・助教  
研究者番号：10574121

中村 寛治 (NAKAMURA Kanji)  
東北学院大学・工学部・教授  
研究者番号：90382655