

(49) 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

石川 奈緒^{1*}・三浦 洵²・伊藤 歩³・海田 輝之¹

¹岩手大学工学部社会環境工学科 (〒020-8551 岩手県盛岡市上田4-3-5)

²由利本荘市役所 (〒015-8501 秋田県由利本荘市尾崎17)

³岩手大学大学院工学研究科フロンティア材料機能工学専攻 (〒020-8551 岩手県盛岡市上田4-3-5)

* E-mail: naoki@iwate-u.ac.jp

比較的高濃度のヒ素含有地下水のヒ素除去処理には、地下水中の亜ヒ酸 (As(III)) をヒ酸 (As(V)) へ酸化する前処理が必要である。本研究では、低コストでの酸化処理のため、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 As(III) 酸化を試みた。バイオリアクターは活性汚泥から単離した亜ヒ酸酸化細菌をポリビニルアルコール製の担体内に固定化して反応槽中に封入したものである。担体量が担体/反応槽体積比で0.1の場合に1 mg- As/L の As(III) 含有水を流入すると、水理学的滞留時間 (HRT) 4時間で As(III) の95%以上を酸化した。また、流入を7日間中断した場合でも As(III) 酸化能に影響はなかった。さらに、流入水の As 濃度が5 mg- As/L に上昇した場合にも As(III) 酸化率は95%に保持された。一方、10 mg- As/L では As(III) 酸化率が60%程度に低下したことから、HRTなど運転条件を変更する必要があることが示された。

Key Words : arsenic contamination in ground water, biological oxidation of arsenite, bioreactor, continuous processing

1. はじめに

ヒ素 (As) の過剰摂取による健康被害は多く知られており、世界保健機関では飲料水質ガイドラインとして飲料水の As 濃度を0.01 mg/Lと定めている¹⁾。一方でバングラデシュや中国、インドなどアジアの多くの地域では、 As が高濃度で含まれる地下水を飲料水や灌漑水として用いているために As による健康被害がいまだ深刻な問題となっている^{2,3)}。そのような背景から、 As 汚染水の As 除去処理技術に関する研究が進められており、鉄やアルミニウムとの凝集や共沈法、吸着剤や膜を用いた処理法が提案されている⁴⁾。これらの処理を効果的に行うためには、前処理として酸化プロセスが必要である。地下水中の As の主要な化学形態は非荷電分子の亜ヒ酸 (H_3AsO_3 : As(III)) であり⁵⁾、凝集や吸着の効率が低い。一方、既存の研究により、ヒ酸 (H_2AsO_4^- , HASO_4^{2-} : As(V)) では鉄や鉱物フロックへの凝集において As(III) より効率がよいことが知られている^{2,6)}。したがって、ヒ素含有水のヒ素除去処理には As(III) 酸化処理として塩素や過マン

ガン酸塩のような酸化剤を用いる方法や、オゾンを用いた方法が確立されている⁷⁾。しかしながら、そのような処理方法は費用がかかるため、特に発展途上地域での実用化において問題点となる。

そこで本研究では、低コストでの水中の亜ヒ酸酸化処理を目的として、亜ヒ酸酸化能を有する微生物 (以下、亜ヒ酸酸化細菌とする) を利用したバイオリアクターによる亜ヒ酸酸化法を検討した。まず、下水処理場の活性汚泥から単離した亜ヒ酸酸化細菌を担体内に固定化させ、反応槽内に封入した。この反応槽に As(III) 含有水を連続的に流入し、 As(III) 酸化率に及ぼす水理学的滞留時間の影響を連続酸化実験により検討した。その際には、反応槽に封入する担体量の影響についても検討した。その後、実際に酸化処理を行う際に想定されるバイオリアクター運転中の状況の変化、すなわち反応槽への As(III) 含有水の流入を一定期間中断した場合や、運転途中で流入水中の As 濃度が上昇した場合について、バイオリアクターの As(III) 酸化能への影響を検討した。

2. 実験方法

(1) 亜ヒ酸酸化細菌

実験に使用した細菌は、岩手県盛岡市にある都南浄化センターのエアレーションタンク内の活性汚泥を100 mg-As/LのAs(III)を含んだ培地で継代培養し単離した後、亜ヒ酸酸化能を有することを確認したヒ素耐性細菌である(図-1)⁹⁾。分離した細菌を16S rDNA塩基配列に基づく系統解析を行った結果、*Ensifer adhaerens*と99.9%の相同性を示した。

亜ヒ酸酸化細菌の培養にはWeegerらの提唱した培地成分¹⁰⁾から有機炭素源である乳酸ナトリウムを除いたものを用いた。初期pHは 7 ± 0.1 に調整した。亜ヒ酸酸化能を有する独立栄養細菌は以下のような反応でAs(III)を酸化することが示唆されており¹¹⁾、本研究で用いた細菌においても同様の反応を起こしていると考えられる。



(2) バイオリアクター

図-2にバイオリアクターの概要を示す。反応槽は内径4 cm、長さ1 mの亚克力パイプであり、反応槽中には亜ヒ酸酸化細菌を固定化した担体(図-1)が封入されている。固定化担体はポリビニルアルコール製のクラゲール(クラレアクア株式会社)を用いた。クラゲールは直径約4 mm、比重1.0で内部に微細な空隙を持つ球状の担体である(図-3)。担体へ亜ヒ酸酸化細菌を固定するため、反応槽内で担体とAs(III)酸化細菌の培養液を継代培養の培地と混合し、培養液中のAs(III)がほぼAs(V)に酸化されるまで回分培養を行った。その作業を2回繰り返した後、連続酸化処理実験を行った。

反応槽の有効体積は1Lであり、反応槽内に封入する担体量の基本条件を担体/反応槽体積比(CR比)で0.1と設定した。

流入水は微量定量ポンプで任意の流量に調節し、反応槽底部から注入した。反応槽に流入するAs(III)含有水のAs(III)以外の組成を表-1に示す。

処理水は反応槽上部の定水位から流出する。各設定流量に対応し、バイオリアクターの水理学的滞留時間(HRT[h])は次式より求めた。

$$\text{HRT} = \frac{V}{Q} \quad (1)$$

ここで、 $V[\text{L}]$ は反応槽中の液相の体積、 $Q[\text{L/h}]$ は流入水の流量である。

また、反応槽中に溶存酸素を供給し、担体を浮遊状態に保つため、反応槽底部から2.5 L/minで曝気を行った。なお、反応槽内の溶存酸素はほぼ飽和していた。バイオ

リアクターを設置している恒温室の温度は25℃に設定した。

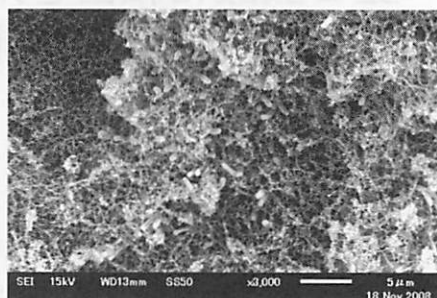


図-1 担体内に固定化した亜ヒ酸酸化細菌

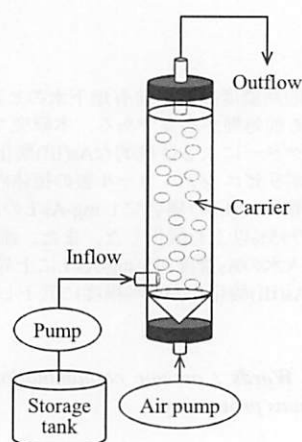


図-2 バイオリアクター概要図

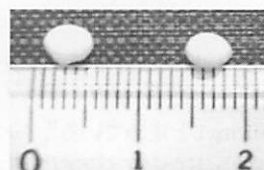


図-3 担体：クラゲール

表-1 流入水の組成

試薬	添加量(mg/L)
MgSO ₄ 7H ₂ O	20
NH ₄ Cl	2.0
Na ₂ SO ₄	10
K ₂ HPO ₄	0.1
CaCl ₂ 2H ₂ O	0.6
FeSO ₄ 7H ₂ O	0.039
NaHCO ₃	8

(3) 連続酸化処理実験

本バイオリアクターで連続酸化処理実験を行い、亜ヒ酸酸化処理能力を確認した。本実験では流入水のAs(III)濃度を1 mg-As/Lに設定した。連続酸化処理ではHRTを0.5～8時間の範囲で数段階設定し、バイオリアクターに連続的にAs(III)含有水を流入した。運転期間中は定期的に流入水および処理水を採取し、採取試料は0.2 μmのメンブランフィルターでろ過した後、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（Agilent, HP4500）を用いてAs(III)およびAs(V)濃度を測定した¹²⁾。加えて、連続運転中での亜ヒ酸酸化細菌の担体への固定量と処理水への流出量を確認するため、定期的に担体中および処理水中の細菌数を血球計算板を用いて計数した。担体中の細菌数については、担体2個をそれぞれ医療用メスで切り刻んだ後、蒸留水を加えホモジナイザーですりつぶして計数し、担体1個当たりの細菌数を得た。その細菌数に反応槽中の全担体数を乗じて反応槽中の担体中細菌数を算出した。

さらに、封入する担体量によるバイオリアクターの亜ヒ酸酸化能の違いについて確認するため、C/R比を0.03とした場合についても同様の連続酸化処理実験を行い、基本条件であるC/R比0.1の結果と亜ヒ酸酸化能を比較した。

(4) 流入の変化に対するバイオリアクターのAs(III)酸化能への影響

バイオリアクターの運転においては、保守管理のための一時的な運転停止や運転中の流入水の水質変化が想定される。それらの状況変化による本バイオリアクターでのAs(III)酸化能に対する影響を検討した。まず、流入

の一時的な中断を想定し、HRT4時間の条件下で連続運転しているバイオリアクターへのAs(III)含有水の流入を7日間停止した後に同じHRTで流入を再開し、再開後の流入水および処理水のAs(III)およびAs(V)濃度を測定した。次に、流入水のAs(III)濃度の変化を想定し、HRT4時間で連続運転中に流入水中のAs(III)濃度を1 mg-As/Lから5 mg-As/Lまたは10 mg-As/Lに上昇させ、流入水および処理水のAs(III)とAs(V)の濃度を測定した。本実験においては、反応槽内に封入する担体量をC/R比で0.1に設定した。

3. 結果と考察

(1) バイオリアクターのAs(III)酸化能

As(III)からAs(V)への酸化処理に関する文献では、As含有水中のAs(III)の95%以上をAs(V)へ酸化するための酸化剤の量が示されている⁹⁾。そこで本研究では、十分なAs(III)酸化処理が行われたとする達成条件として、酸化率が95%以上であることとした。

まず、基本条件であるC/R比を0.1とした場合のバイオリアクターのAs(III)酸化能と細菌数の変動について検討する。図-4に、連続酸化処理実験を行っている間の流入水および処理水中のAs濃度の経時変化を示す。どのHRTでも流入水中のAs(III)はバイオリアクターでの処理により連続的にAs(V)に酸化されており、本バイオリアクターが安定してAs(III)の連続酸化を行うことができることが確認された。なお、貯留タンク中に保管している流入水でAs(III)酸化が生じていないことから、As(III)酸化は主に反応槽中に固定された亜ヒ酸酸化細菌によると考えられる。

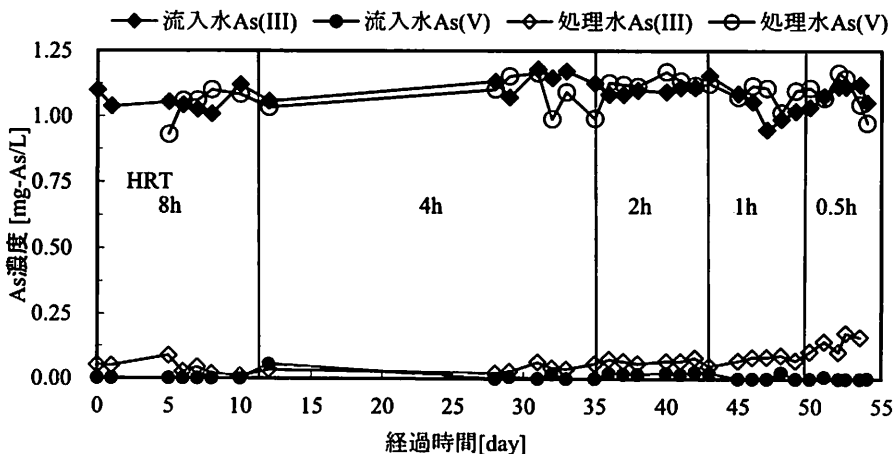


図4 連続実験中のAs濃度の経時変化(C/R比 : 0.1)

HRTごとの反応槽内の担体および液相中の細菌数を図-5に示す。図の各点は各HRTで運転中の全データの平均値であり、エラーバーはその標準偏差である。反応槽中に存在する亜硫酸酸化細菌の98%以上は担体中に存在しており、液相中への細菌の流出および液相中の細菌による亜硫酸酸化の寄与は非常に小さく、担体中の細菌が主に亜硫酸酸化を担っていることがわかる。次に、HRTごとの酸化率を図-6に示す。図の各点は各HRTで運転中の全データの平均値であり、エラーバーはその標準偏差である。HRTが4時間以上であれば、反応槽中の細菌数は 2×10^{11} Cells/reactor程度で一定であるとともに（図-5）、処理水中のAs(III)は95%以上酸化されており十分なAs(III)酸化処理が行われていた。それに対してHRTが2時間以下では、HRTが短くなるほど基質としてのAs(III)の負荷量が増加するために担体中の細菌数は増加しているが、As(III)酸化率は減少し、さらにHRTが0.5時間では87%まで低下した。以上のことから、As(III)濃度が1 mg-As/Lの流入水の場合、本バイオリアクターはHRTが4時間以上で安定したAs(III)酸化処理能力を有することが示唆された。

バイオリアクターに封入する担体量の影響を見るため、C/R比を0.03に減じた場合の流入水および処理水中のAs濃度の経時変化を図-7に示す。HRTが1時間以下では連続的なAs(III)酸化処理が安定に行われていなかった。加えて、As(III)酸化率を図-8に、反応槽中の担体および液相中の細菌数を図-9にそれぞれHRTごとに示す。HRT 3時間では96%と高いAs(III)酸化率を示したが、HRTを1時間に短縮すると93%まで低下していた。

図-5と図-9を比較すると、反応槽中の担体量は約3倍異なるのに対し担体中の細菌数は20倍以上の差が表れていた。この理由について今後検討する必要があるものの、両条件においてAs(III)酸化率が95%以上となるHRTに大

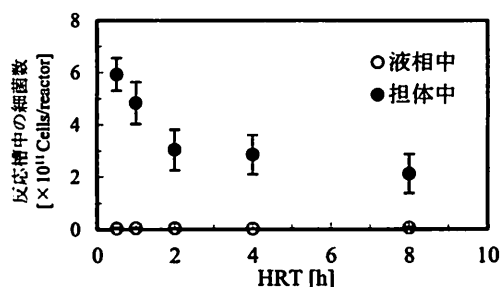


図-5 各滞留時間での反応槽中の担体および液相中の細菌数 (C/R比 : 0.1)

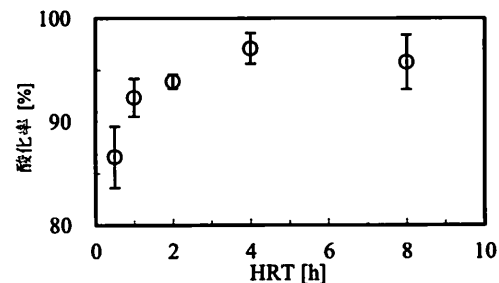


図-6 滞留時間によるAs(III)酸化率(C/R比 : 0.1)

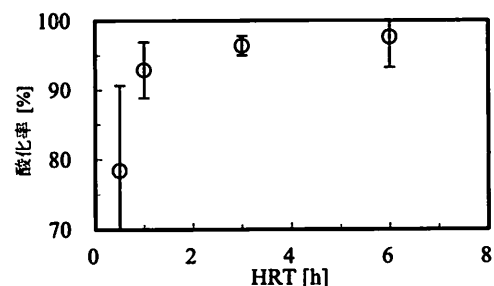


図-8 滞留時間によるAs(III)酸化率(C/R比 : 0.03)

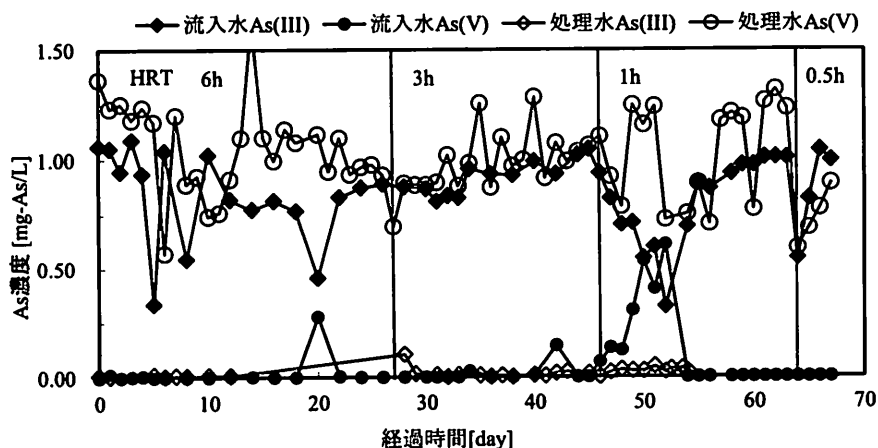


図-7 連続実験中のAs濃度の経時変化(C/R比 : 0.03)

きな差は見られなかった。したがって、C/R比を0.03に減じた場合でも通常条件と同程度の亜ヒ酸酸化能を有することが示唆された。

(2) 流入水の供給を一時停止し再開した場合の影響

図-10にAs(III)含有水の流入を7日間停止し再開した後の流入水および処理水中のAs濃度の時間変化を化学形態毎に示す。流入水中のAs(III)は処理水ではほぼ100%がAs(V)に酸化されており、運転停止前と同程度の酸化能を保持していた。このことから、7日間程度As(III)の供給を停止してもその後のAs(III)酸化能に影響しないことが示された。

(3) 流入水のAs(III)濃度が変化した場合の影響

図-11に、流入水のAs(III)濃度を1 mg-As/Lから5 mg-As/L (図-11A) または10 mg-As/L (図-11B) に変更して運転を継続した場合の流入水および処理水中のAs(III)とAs(V)の濃度の経時変化を示す。流入水中のAs(III)濃度が5 mg-As/Lまで上昇した場合、運転4時間程度で流入水中のAs(III)の97%以上がAs(V)に酸化されており、その後も安定して同程度の酸化率を示した。しかしながら10 mg-As/Lに上昇した場合には濃度上昇24時間運転を継続した場合でもAs(III)酸化率は60%程度に留まった。したがって、本研究で開発したバイリアクターの場合、現在設定されている基本条件では5 mg-As/L以下の流入水では十分なAs(III)酸化処理を行うことができ、As(III)濃度が10 mg-As/Lまで上昇した場合にはHRTや担体量などの条件を変更して酸化処理を行う必要がある。

実際に高濃度のAsを含む地下水の調査において、バングラデシュでは17地点での調査の結果最大As濃度が0.461 mg/Lであり¹³⁾、また他の報告では64地区で行われた掘り抜き井戸の水質調査において、水中のヒ素濃度が1 mg/L以上であった水試料は52000以上の試料のうち0.6%であり、最大検出ヒ素濃度は4.730 mg/Lであった¹⁴⁾。本バイリアクターでは高濃度域において十分な処理が可能であるといえるため、今後より広い地域での利用に向けて低濃度域での処理能力について検討する必要がある。

また、実際のAs含有地下水は二価鉄も含有している場合が多く、反応槽内で酸化された三価鉄の担体表面や内部への付着に伴う閉塞の問題についても今後の検討課題である。

(4) 亜ヒ酸酸化細菌のAs(III)酸化能と今後の展開

図-12に、HRTごとのAs(III)比酸化活性を示す。C/R値0.03の方が0.1よりも全てのHRT条件下で比活性が大きく、担体の充填割合(担体へのAs(III)負荷)に応じた細菌の順応が確認された。本研究の結果として、担体コストと

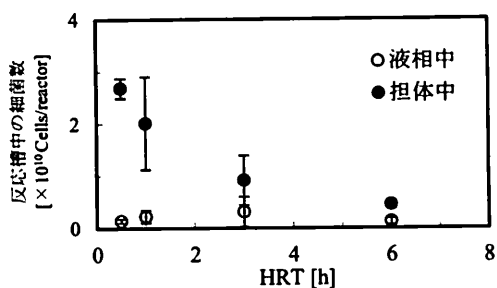


図-9 各滞留時間での反応槽中の担体および液相中の細菌数 (C/R比: 0.03)

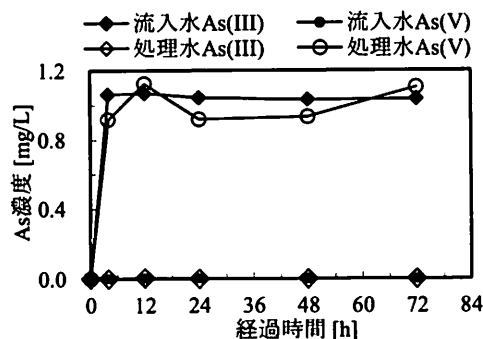


図-10 流入再開後のAs(III)及びAs(V)濃度の経時変化

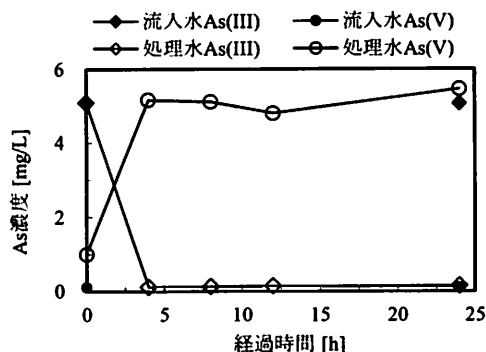


図-11A 流入水のAs(III)を1 mg-As/Lから5 mg-As/Lに上昇させた後の流入水および処理水のAs(III)濃度

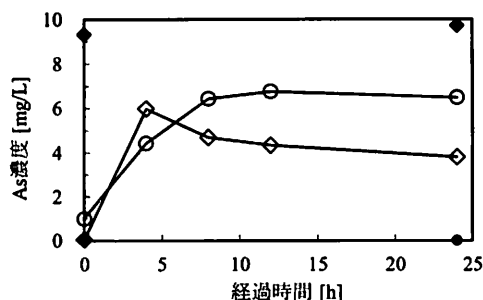


図-11B 流入水のAs(III)を1 mg-As/Lから10 mg-As/Lに上昇させた後の流入水および処理水のAs(III)濃度

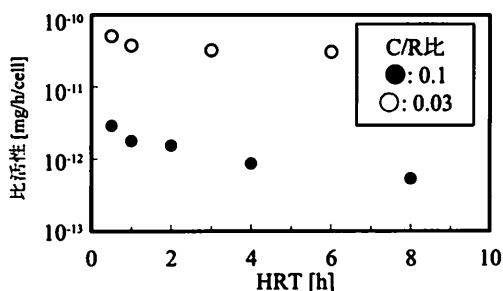


図-12 HRTごとのAs(III)比酸化活性

As(III)酸化率を考慮すると、C/R比0.03およびHRT3時間の条件下で運転を行うことが現時点で最適であると考えられる。

一方、本バイオリアクターは曝気を行うためのエネルギーを必要とする。したがって、曝気動力を最小化しつつ、あるいは曝気装置なしでも酸素供給を十分に行うことができるような反応槽の改良も、今後の更なる展開を図るために重要であると考えられる。

4. まとめ

本研究では、*Ensifer adhaerens*と99.9%の相同性を示した亜ヒ酸酸化細菌を固定化させた担体を用いてバイオリアクターを開発した。本装置では、流入水中のAs(III)濃度が1 mg-As/L、HRTが4時間であればAs(III)の95%以上をAs(V)へ酸化し、十分な酸化処理能力を有することが示された。また、運転時に起こりうる状況変化についての影響を検討し、一定期間の流入中断後の再運転に関しては7日間程度であればAs(III)酸化能に影響はなく、また流入水のAs濃度が5 mg-As/Lまで上昇してもAs(III)酸化率は95%程度保持しているが、10mg-As/Lまで上昇した場合にはHRTなどの運転条件を変更する必要性が示された。

参考文献

- 1) World Health Organization: Guidelines for drinking-water quality, third edition, incorporating first and second addenda, 2004.
- 2) Kinniburgh D.G. and Smedley P.L.: Arsenic contamination of groundwater in Bangladesh, Vol.1: Summary, BGS Technical Report WC0019, 2001.
- 3) Ning Z., Lobdell D.T., Kwok R.K., Liu Z., Zhang S., Ma C., Riediker M. and Mumford J.L.: Residential exposure to drinking water arsenic in Inner Mongolia, China, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, Vol.222, No.3, pp. 351-356, 2007.
- 4) Ahamed S., Sengupta M.K., Mukherjee A., Hossain M.A., Das B., Nayak B.,

Pal A., Mukherjee S.C., Pati S., Dutta R.N., Chatterjee G., Mukherjee A., Srivastava R. and Chakraborti D.: Arsenic groundwater contamination and its health effects in the state of Uttar Pradesh (UP) in upper and middle Ganga Plain, India: A severe danger, *Sci. Total Environ.*, Vol.370, No.2-3, pp. 310-322, 2006.

- 5) United States Environmental Protection Agency: Arsenic Treatment Technology Evaluation Handbook for Small Systems, EPA 816-R-03-014, 2003.
- 6) Smedley P.L. and Kinniburgh D.G.: A review of the source, behaviour and distribution of arsenic in natural water, *Appl. Geochem.*, Vol.17, No.5, pp. 517-568, 2002.
- 7) Roberts L.C., Hug S.J., Ruettimann T., Billah M., Khan A.W. and Rahman M.T.: Arsenic removal with iron(II) and iron(III) in waters with high silicate and phosphate concentrations, *Environ. Sci. Technol.*, Vol.38, No.1, pp. 307-315, 2004.
- 8) Pallier V., Feuilade-Cathalifaud G., Serpaud B. and Bollinger J.C.: Effect of organic matter on arsenic removal during coagulation/flocculation treatment, *J. Colloid Interface Sci.*, Vol.342, No.1, pp. 26-32, 2010.
- 9) 伊藤歩, 三浦洵一, 相澤治郎, 海田輝之: 活性汚泥から分離した細菌による亜ヒ酸の生物学的酸化に関する基礎的研究, 環境工学研究論文集, Vol. 45, pp.219-224, 2008.
- 10) Weeger W., Lièvreumont D., Perret M., Lagarde F., Hubert J.C., Leroy M. and Lett M.C.: Oxidation of arsenite to arsenate by a bacterium isolated from an aquatic environment, *Biometals*, Vol.12, No.2, pp. 141-149, 1999.
- 11) Santini J.M., Sly L.I., Schnagl R.D. and Macy J.M.: A new chemolithoautotrophic arsenite-oxidizing bacterium isolated from a gold mine: phylogenetic, physiological, and preliminary biochemical studies, *Appl. Environ. Microbiol.*, Vol.66, No.1, pp. 92-97, 2000.
- 12) Martínez-Bravo Y., Roig-Navarro A.F., López F.J. and Hernández F.: Multielemental determination of arsenic, selenium and chromium(VI) species in water by high-performance liquid chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry, *J. Chromatogr. A*, Vol.926, No.2, pp. 265-274, 2001.
- 13) Halim M.A., Majumder R.K., Nessa S.A., Oda K., Hiroshiro Y., Saha B.B., Hossain S.M., Latif Sk.A., Islam M.A., Jinno K.: Groundwater contamination with arsenic in Sherajildhan, Bangladesh: geochemical and hydrological implications, *Environ. Geol.*, Vol.58, No.1, pp. 73-84, 2009.
- 14) Chakraborti D., Rahman M.M., Das B., Mumil M., Dey S., Chandra Mukherjee S., Dhar R.K., Biswas B.K., Chowdhury U.K., Roy S., Sait S., Selim M., Rahman M., Quamruzzaman Q.: Status of groundwater arsenic contamination in Bangladesh: a 14-year study report, *Water Research*, Vol. 44, No. 19, pp. 5789-5802, 2010.

(2011.5.30 受付)

Continuous arsenite oxidation treatment by a bioreactor using arsenite-oxidizing bacteria

Nao ISHIKAWA¹, Junichi MIURA², Ayumi Ito³ and Teruyuki UMITA¹

¹Dept. of Civil and Environmental Engineering, Iwate University

²Yurihonjo city

³Dept. of Frontier Materials and Function Engineering, Graduate School of Engineering, Iwate University

The continuous arsenite (As(III)) oxidation was investigated with a cylindrical bioreactor including arsenite-oxidizing bacteria. The low cost As(III) oxidation process may become part of an As removal treatment for drinking water. The bacteria used for the bioreactor were isolated from activated sludge collected from an aeration tank at sewage treatment plant in Iwate prefecture and had 99.9% 16S rRNA sequence similarity with *Ensifer adhaerens*. Spherical polyvinyl alcohol carriers in which the bacteria were kept were included at a concentration of 30 or 100 mL per L of reactor volume for the basic condition. More than 95% of the As(III) was oxidized when the As(III) concentration was 1 mg-As/L and hydraulic residence times (HRT) were longer than 4 hrs. Additionally, the ability of the bioreactor to oxidize As(III) was not lowered even though inflow of As(III)-containing water was stopped for 7 days. At the increased As(III) concentration of 10 mg-As/L, the ability to oxidize As(III) decreased; only 60% of the As(III) concentration was oxidized for a HRT of 4 hrs. Therefore, it is necessary to change the operating conditions such as HRT for higher As(III) concentrations than 10 mg-As/L.