

亜ヒ酸酸化能を有する細菌群を用いた ヒ素の連続除去処理

瀬川 奈未¹・菅野 健人²・石川 奈緒^{2*}・
伊藤 歩³・中村 寛治⁴・海田 輝之²

¹岩手大学大学院工学研究科社会環境工学専攻（〒020-8551 岩手県盛岡市上田4-3-5）

²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）

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）

⁴東北学院大学工学部環境建設工学科（〒985-8537 宮城県多賀城市中央1-13-1）

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

地下水中のヒ素（As）の摂取による健康被害はアジア地域をはじめとして世界的に深刻である。Asの除去は凝集や吸着による処理が行われているが、その効率を上げるために、前処理として地下水中のAsの主要存在形態である亜ヒ酸（As(III)）をヒ酸（As(V)）に酸化させる必要がある。本研究では、活性汚泥から亜ヒ酸酸化能を有する細菌群を集積培養し、16S rRNA遺伝子解析に基づいた優占種の同定を行うとともに、異なる培養条件による亜ヒ酸酸化特性を検討した。さらに、曝気装置・酸化剤・凝集剤不使用の経済的な地下水中のAs除去手法の開発を目指し、Down-Flow Hanging Spongeリアクターを用いてAs(III)の生物学的連続酸化及び地下水中のFe(II)を利用したAs共沈除去の可能性について検討した。その結果、流入As(III)及びFe(II)濃度が各々0.5，25 mg/Lでは、As除去率は約95.1%で水道水質基準値である0.01 mg/L付近まで除去することができた。

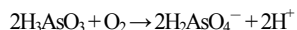
Key Words : *biological oxidation of arsenite, economical arsenite removal method, Down-Flow Hanging Sponge reactor, 16S rRNA gene analysis*

1. はじめに

バングラデシュ、インド、ベトナム、中国などのアジア地域において、地下水に含まれるヒ素（As）の継続的な摂取による健康被害は非常に深刻であり、皮膚がんなどの致命的な症状が引き起こされている^{1,2)}。また、地下水のAs汚染が深刻な地域の地層によっては、地下水からAsと共に第一鉄（Fe(II)）やマンガンが検出されている地域も報告されており、Asと共にこれらの重金属の除去方法も開発されてきている³⁾。

Asは水環境中で亜ヒ酸（As(III)）またはヒ酸（As(V)）の形態で存在し、中性付近でAs(V)は H_2AsO_4^- や HAsO_4^{2-} の陰イオンとして、一方、As(III)は非荷電分子の H_3AsO_3 として存在している。地下水はAs(III)を主成分とする場合が多く、中性付近ではAs(III)のAs(V)への空気酸化速度は、非常に遅いことが知られている⁴⁾。したがって、地下水中のAs除去処理は、膜を用いた方法を除いて次亜塩素酸、過マンガン酸カリウム、過酸化水素やオゾン等

の酸化剤を用いてAs(III)をAs(V)に酸化した後、凝集または吸着処理が行われている^{4,6)}。近年では、酸化剤や凝集剤のコストの問題から、経済的なAs(III)酸化法として亜ヒ酸酸化能を有する微生物を用いた方法が実験的に検討されている^{7,8)}。また、種々の環境中より独立栄養性のAs(III)酸化能を有する細菌が分離されており⁹⁾、



のようにAs(III)がAs(V)に酸化されると考えられている。

著者ら¹⁰⁾は、亜ヒ酸酸化能を有する細菌群の固定化担体として、大きな空隙率を有し、通気性が良く、微生物を高濃度に保持できる等の特徴を有している吊り下げ式スポンジ担体（Down-Flow Hanging Sponge : DHS）¹¹⁾を使用し、曝気装置及び酸化剤を使わず生物学的にAs(III)の連続酸化が可能であることを明らかにした。

本研究では、亜ヒ酸酸化能を持つ集積培養系の細菌群の16S rRNA遺伝子を解析し、また、溶存酸素、温度、pHが亜ヒ酸酸化に及ぼす影響を検討した。さらに、著者らのDHSリアクターを用いたAs(III)の生物学的連続酸

化実験を進展させ、曝気装置・酸化剤に次いで、凝集剤の不使用も目指したより経済的な地下水中のAs除去手法を開発すべく、地下水中のFe(II)をAs共沈除去に利用することを想定し、流入水にFe(II)を添加した実験を行い検討した。

2. 実験方法

(1) ヒ素及び鉄の分析

試料中のAsの形態別分析は、酒井らの分析方法¹²⁾に基づいて行った。測定は、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（以下、HPLC-ICP-MSとする）。

また、流入及び流出水中のFe(II)とFe(III)濃度は、1,10-フェナントロリン法¹³⁾によって定量した。

(2) 亜ヒ酸酸化能を有する細菌群の集積培養

亜ヒ酸酸化能を有する細菌群の集積培養を行うため、比較的Asを多く含む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100 mLを、As(III)を100 mg/L含むWeegerらの培地¹⁴⁾の成分のうち有機炭素源である乳酸ナトリウムを除いた無機培地（表-1）1 Lに植種し、約3ヶ月継代培養を行った¹⁰⁾。pHは、HClまたはNaOH溶液を用いて7.0±0.1に調整した。

集積培養した細菌群の16S rRNA遺伝子解析のため、培養液からのDNA抽出は既報¹⁵⁾に示したとおりに行った。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Bac9f (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群の16S rRNA遺伝子をPCR増幅した。酵素はEx Taq Hot Start Version（タカラバイオ）を使用した。PCR反応は、Pre-heating（94℃, 2分）に続き、第1段階（94℃, 20秒）、第2段階（55℃, 30秒）、第3段階（72℃, 2分）を30サイクル繰り返し、Post extension（72℃, 7分）を行った。PCR増幅産物は、マイクロスピナカラムS-300 HR（GEヘルスケア）でプライマーを除去した後、TAクローニング用のプラスミドベクター pKNA90XT¹⁶⁾にクローン化した。取得した16S rRNA遺伝子は3130 Genetic Analyzer（アプライドバイオシステムズ）によって塩基配列を決定し、National Center for Biotechnology Information (NCBI)のBLASTを利用して近縁種の探索を行った。

培養液中の細菌数はトーマ氏血球計算盤を用いて計数した。

(3) 回分実験

亜ヒ酸酸化能を有する細菌群について、溶存酸素(DO)、pH、水温のAs(III)酸化速度に及ぼす影響を回分実験により検討した。なお、下記a)～c)の各実験の植種に関しては、2.(2)で述べた継代培養液の亜ヒ酸酸化細菌群の増殖が定常期を迎えた時点を採用した。定常期は、HPLC-ICP-MSによるAs(III)濃度の分析結果から判断した。また、各実験に用いた培地の成分は継代培地（含有As(III)初期濃度100 mg/L）と同様である。

a) 亜ヒ酸酸化能に対するDOの影響

培地300 mLを、NaOH溶液とHClを用いてpHを7に調整した。亜ヒ酸酸化能に対するDOの影響を確認するため、以下3つの条件（温度は全て25℃）で実験を行った。

- ① DOあり・植種なし
- ② DOあり・植種あり
- ③ DOなし・植種あり

「DOあり」の条件（①、②）では、振とう機にて攪拌を行うことで、培養液中へ十分なDOを供給した。「DOなし」の条件（③）では、常時窒素で曝気し、DOをほぼ0 mg/Lにした。また、「植種あり」の条件（②、③）では継代培養液（ 5.2×10^6 cell/mL）を1 mL植種した。

b) 亜ヒ酸酸化能に対するpHの影響

培地300 mLを7つ用意し、各培地にNaOH溶液とHClを用いて、pHを4, 5, 6, 7, 8, 9, 10に調整した。その後、継代培養液（ 1.6×10^7 cell/mL）を1 mL植種し、振とう機にて25℃で攪拌し、経時的にAs(III)及びAs(V)濃度を測定した。各培養液のpH調整は、毎日朝夕2回行った。

c) 亜ヒ酸酸化能に対する温度の影響

培地300 mLにNaOH溶液とHClを用いて、pHを7に調整した。その後、各培地の水温が15, 20, 25, 30℃になるように調整した。設定温度に達した時点で、各培地に継代培養液（ 7.84×10^6 cell/mL）を1 mL植種し、振とう機にて攪拌し、経時的にAs(III)及びAs(V)濃度を測定した。

表-1 継代培養に用いた培地成分

成分	濃度(g/L)
MgSO ₄ ·7H ₂ O	2
NH ₄ Cl	0.2
Na ₂ SO ₄	1
K ₂ HPO ₄	0.001
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0.06
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0.0033
NaHCO ₃	0.8
As ₂ O ₃	0.132

(4) DHSリアクターを用いた亜ヒ酸酸化実験

a) DHSリアクター

図-1にDHSリアクターの写真を示す。亜ヒ酸酸化細菌群の付着担体として、円筒形のスポンジ（ポリウレタン製）を用いた。スポンジは直径約3 cm、長さ約3 cm、体積は約21.2 cm³、空隙率は約0.98であり、この円筒形のスポンジを25個釣り下げた。定量ポンプとシリコンチューブを用いて実験条件に応じた溶液をリアクター上部から流下させた。装置は二系統作製し、二つの異なる実験条件について同時に実験を行った。リアクターは25℃の恒温室内に設置し、スポンジの乾燥を抑制するため、湿度は80%に設定した。リアクターの滞留時間は、著者ら¹⁰⁾の方法に基づいて設定した。

b) 連続除去実験

図-2に前培養及び連続除去実験の装置の概略を示す。前培養では、滞留時間を1 hとし、2.(2)で示した培養液（As(III)濃度100 mg/L）を約一週間循環させ、スポンジに細菌群を固定化した。

連続除去実験では、滞留時間を2 hとし、上記の培地のうち流入水のAs(III)濃度を0.5 mg/L、Fe(II)濃度を5 mg/L及び25 mg/Lとなるよう培地貯蔵タンクに作成した。既往の研究より、凝集沈殿ではFe/As（質量比）が40以上の場合に効率的にAsを除去できることが報告されている¹⁷⁾。地下水中にはAsとFeが共存しており、Feの濃度も様々である¹⁸⁾。したがって、本研究では、流入水のAs(III)濃度0.5 mg/Lに対して流入Fe(II)濃度5 mg/L（Fe/As = 10）及び25 mg/L（Fe/As = 50）と設定し、各Fe/As比によるAs除去率を比較した。なお、この培地中のFe(II)が空気酸化されるのを極力避けるために培地は常時窒素曝気した。

連続除去実験開始時は図-2(a)の装置構成を採用していたが、流入前にAsとFeが培地貯蔵タンク内で共沈してしまうため、連続除去実験開始から33日目に図-2(b)の装置構成に変更した。流入水のAs(III)とFe(II)の設定濃

度及び滞留時間の条件は変更せず、As(III) = 1 mg/Lを含む無機培地（pH：7）とFeSO₄溶液（Fe(II)：10、50 mg/L、pH：4）を別個に体積比として1：1で装置に流入させ、滞留時間を2 hとした。流入水のpHは6～6.5程度であった。

流入水と流出水を定期的に採取し、孔径0.2 µmのメンブレンフィルターでろ過した後、ろ液中のAs(III)及びAs(V)濃度をHPLC-ICP-MSで測定した。

c) リアクター鉛直方向のAs、Fe、細菌数の分布

リアクターの鉛直方向における形態別As濃度の変化を把握するために、連続除去実験最終日（運転開始から57日目）にシリンジを用いて任意の位置のスポンジから試料を採取し、上記と同様の方法でAs(III)とAs(V)濃度を測定した。

連続除去実験最終日に、リアクター内に残留したAsとFe量を測定するため、リアクターの解体に伴い任意の位置のスポンジを採取して3 MのHNO₃に浸した後、スポンジを絞ることによってAs及びFeを溶出させた。この操作を3回以上繰り返し行った。溶出させた試料は酸分解処理を行い、AsとFe濃度を各々ICP-MS及びICP発光分析装置（島津、ICPE-9000）で測定した。

連続除去実験終了後に、リアクター内の鉛直方向における細菌数を計数した。上述の酸分解処理前の試料を100 mLまたは200 mLに希釈した後、トーマ氏血球計算盤を用いて計数した。

3. 結果及び考察

(1) 集積培養した細菌群の16S rRNA遺伝子解析

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-2のようにClone Type 1～8として整理した。



図-1 DHSリアクター

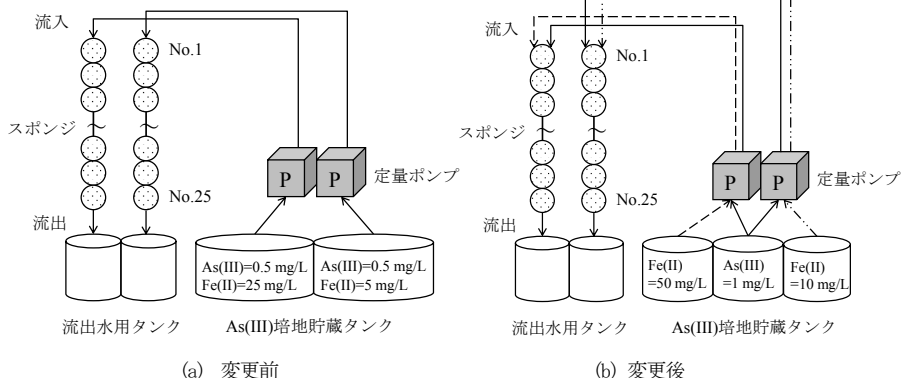


図-2 連続除去実験の装置の概略

1つのClone Typeは相同性が99%以上とした。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-2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 6
と7以外は、99%以上の極めて高い相同性を示した。

Pseudomonas putida は芳香族物質の酸化能を有する細
菌で、有機物を含まない本培地中での機能は不明であ
る。*Nitrosospora* sp.は硝化細菌¹⁹⁾であり、培地中にアンモ
ニアを含んでいるため存在していると考えられる。
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²⁰⁾。*Hydrothalea* のある種は温泉水から分
離²¹⁾ されている。*Trachelomonas volvocinopsis* はシアノバ
クテリアである。*Comamonas* sp. のある種は活性汚泥中
から分離され、As(V)に耐性があるもの²²⁾ も報告されて
いる。

以上の過去の報告から、検出されたClone中では、
Rhizobium sp. が亜硫酸酸化に関与した可能性が示された。
しかしながら、Clone Type 3と*Rhizobium* sp. NT-26株の16S
rRNA遺伝子の相同性を算出した結果、その値は92.8%
と低く、本解析結果のみでは亜硫酸の酸化に関与した
かどうかは特定できなかった。

(2) 回分実験

a) 亜硫酸酸化に及ぼすDOの影響

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」での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群が
存在しない条件下ではAs(III)はほとんど酸化されず、逆
に、植種して細菌群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硫酸酸
化は起こることはなく、細菌群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群は好気条件
下で亜硫酸酸化を行う細菌であると判断された。

b) 亜硫酸酸化に及ぼすpHの影響

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。

pH 8の場合、16日間のラグの5日後に酸化が完了した
ことから、細菌群がpH 8の環境に順応したと推測し、
pH 8の培養液からさらに1回植種し、同様のAs(III)酸化実
験を行った。同様に、pH 5、7の場合もさらに1回植種し、
pH 5、7、8の2回目のAs(III)酸化実験を比較した結果を図
-5に示す。pH 8の場合、pH 7の場合と同様に3日で酸化
が完了したことから、細菌群がpH 8の環境に馴致した
と考えられる。

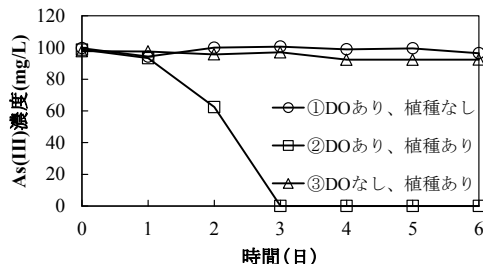


図-3 DO及び植種の影響によるAs(III)濃度の経時変化

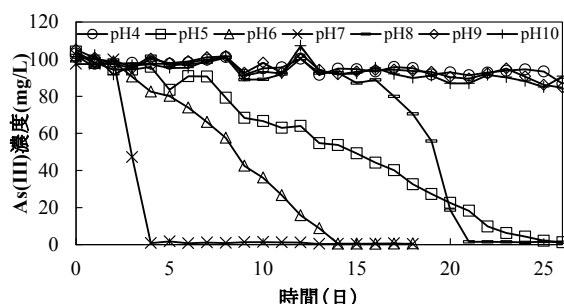


図-4 各pHにおけるAs(III)濃度の経時変化

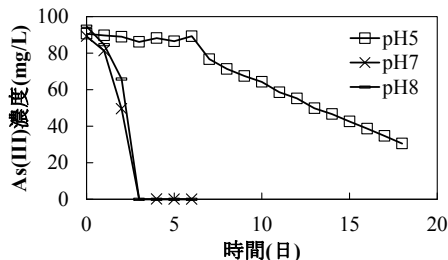


図-5 pH 5、7、8におけるAs(III)濃度の経時変化

表-2 16S rRNA 遺伝子クローンの解析結果

Clone Type	取得Clone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>Nitrosospora</i> sp. Nsp65	99.4	AY123813
3	9	14.8	<i>Rhizobium</i> sp. p49	99.8	HQ652582
4	6	9.8	<i>Pseudaminobacter defluvii</i> NBRC 14570	99.9	AB680636
5	6	9.8	<i>Hydrothalea</i> sp. AF-51	99.0	JF739858
6	5	8.2	<i>Trachelomonas volvocinopsis</i> UTEX1313	97.5	FJ719709
7	5	8.2	Uncultured bacterium clone lp304	94.3	KC331522
8	3	4.9	<i>Comamonas</i> sp. VT13	100	JQ433933

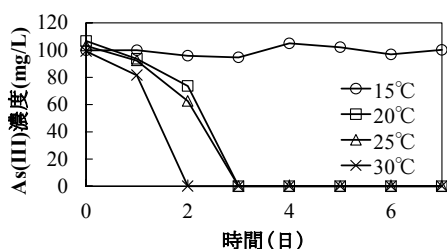


図-6 各水温におけるAs(III)濃度の経時変化

c) 亜ヒ酸酸化に及ぼす水温の影響

図-6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日目ではほぼ100%酸化した。次に水温20、25℃の場合で、3日目ではほぼ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。

(3) 連続除去実験

a) 形態別As濃度の経時変化

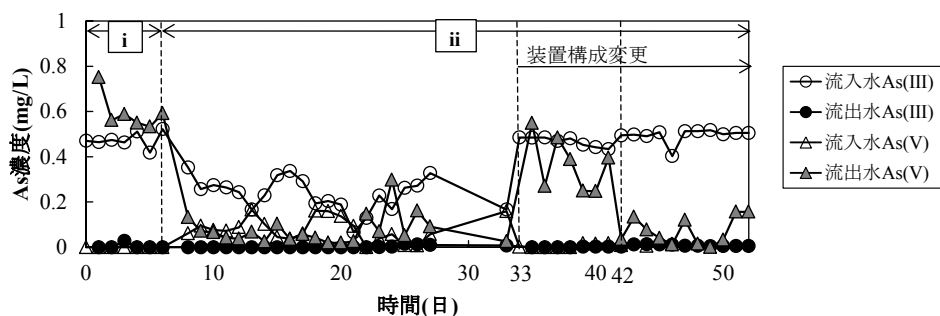
図-7に流入As(III)濃度を0.5 mg/L、流入Fe(II)濃度を5 mg/Lまたは25 mg/L、HRT 2 hとした場合の流入水と流出水の形態別As濃度の経時変化を示す。なお、図中の期間(i)ではFe(II)を添加せず、期間(ii)では添加した。また、33日目以降は、図-2(b)の装置構成に変更した期間を示している。図-7の期間(i)において流出水As(V)が流入水As(III)を大幅に上回っていた。これは、2.(4) b)で述べた

前培養の際に流入As(III)濃度を100 mg/Lとして約一週間循環させたため、その後の連続除去実験の期間(i)ではスポンジに残留していた前培養時の高濃度Asが流出水中から検出されたと考えられる。図-7(a)の42日目の縦の点線は、As除去率が安定したことを示している。

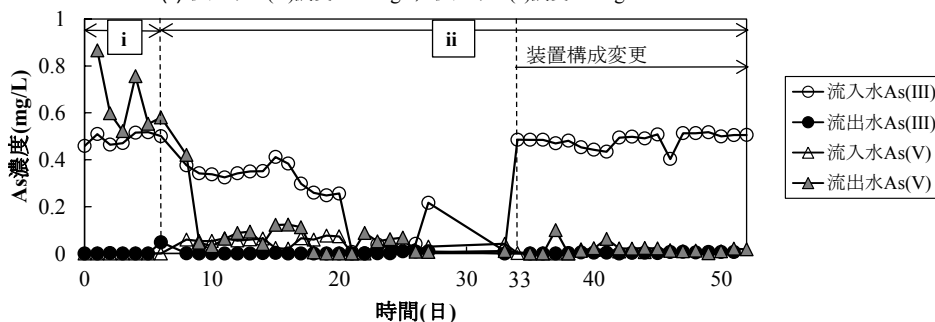
図-7の期間(ii)において、流入口から0.5 mg/Lで流入したAs(III)が、流出口ではほぼ0 mg/Lとなっており、一方、流入口ではほとんど検出されなかったAs(V)が、流出口ではAs(III)初期濃度と同程度の値で検出された。このことから、リアクター内に亜ヒ酸酸化能を有した細菌群が固定化され、かつAs(III)の酸化活動が行われていることが確認され、両リアクターで94.3%以上のAs(III)がAs(V)に酸化されていた。なお、As(III)の酸化率は次式より求めた。

$$\text{As(III)酸化率 (\%)} = \frac{(\text{流入As(III)濃度} - \text{流出As(III)濃度})}{\text{流入As(III)濃度}} \times 100$$

図-7の期間(ii)において、装置構成変更前は、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、装置構成変更後、流入As(III)濃度を一定に保つことができ、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。一方、流入Fe(II)濃度が25 mg/Lの場合では、最大100%、平均



(a) 流入水As(III)濃度：0.5 mg/L、流入水Fe(II)濃度：5 mg/L



(b) 流入水As(III)濃度：0.5 mg/L、流入水Fe(II)濃度：25 mg/L

図-7 流入水と流出水の形態別As濃度の経時変化

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。なお、Asの除去率は次式より求めた。

$$\text{As除去率(\%)} = \{1 - (\text{流出T-As濃度} / \text{流入T-As濃度})\} \times 100$$

$$\text{T-As} : \text{As(III)} + \text{As(V)}$$

b) リアクター内の鉛直方向でのAs濃度とFe(II)濃度の変化

図-8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、各々のリアクター上部に細菌群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2.3～0.5 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2 h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群が存在していたとも考えられ、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。

しかしながら、両リアクターとも流出水にFe(II)が水道水質基準値以上残存しており、リアクター内でのFe(II)の酸化の促進について検討する必要がある。

c) リアクター内に残留したAsとFe量

図-9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、

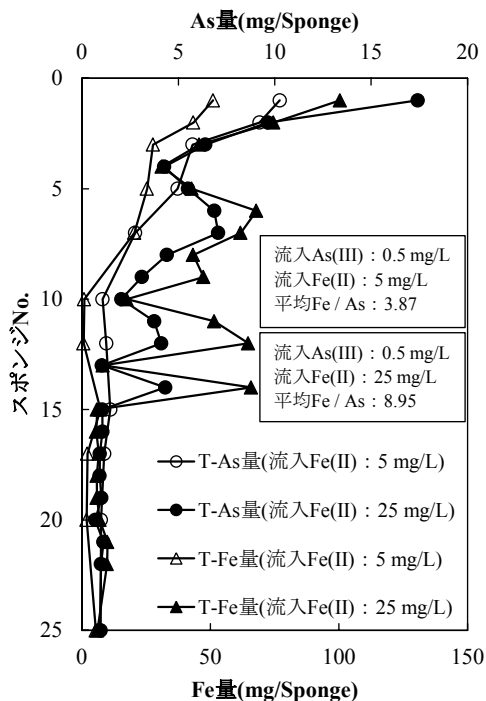
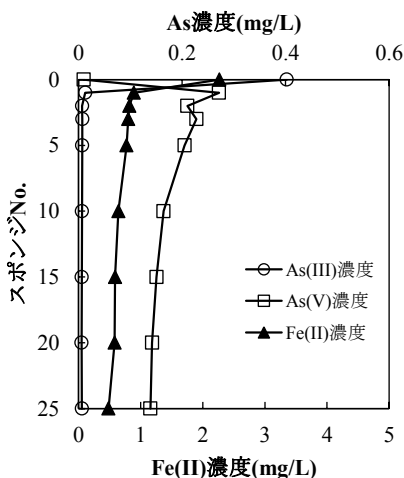
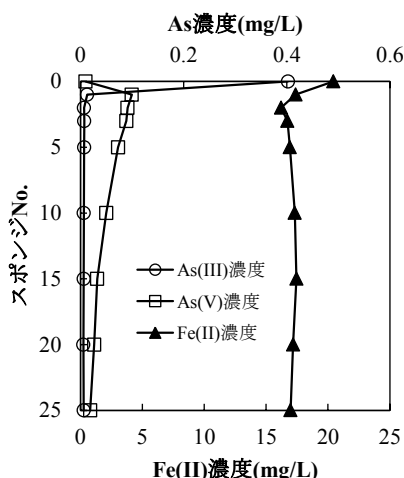


図-9 リアクター内に残留したAsとFe量の鉛直分布



(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-8 連続除去実験最終日の鉛直方向の形態別As濃度とFe(II)濃度の変化

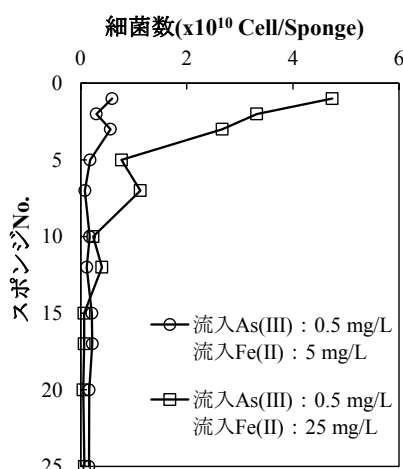


図-10 連続除去実験終了後のリアクター内の細菌数

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)濃度を今後明らかにする予定である。

d) リアクター内の細菌数

図-10に連続除去実験終了後のリアクター内の細菌数を示す。それぞれのリアクターでは、上部のスポンジほど細菌が多く存在しており、流入Fe(II)濃度が5 mg/Lの場合、スポンジ1個目及び25個目の細菌数が、それぞれ 5.9×10^9 , 1.6×10^9 Cell/Sponge, 同様に流入Fe(II)濃度が25 mg/Lの場合、 4.7×10^{10} , 7.1×10^8 Cell/Spongeであった。なお、細菌数の計数に用いた溶液は、2(4) c)で述べたリアクター内のAsとFe量の測定のために任意の位置のスポンジを3 M HNO₃に浸してAsとFeを溶解流出させた溶液であるため、HNO₃による細菌群の生態への影響から、本来はさらに多い細菌数であった可能性が高いと考えられる。

4. まとめ

本研究では、無機培地を用いて活性汚泥から亜硫酸酸化能を有する細菌群を集積培養し、16S rRNA 遺伝子解析を行った。その結果、集積培養液中で優占化した細菌種を把握することができた。しかしながら、亜硫酸酸化細菌を特定するには至らなかった。今後は亜ヒ

酸酸化細菌の単離により、その特定を進めていく必要がある。また、細菌群の特性を知るために DO, pH, 水温による影響を明らかにした。次に、集積培養した細菌群をリアクター内のスポンジ担体に固定化した。無曝気条件下で As(III)と Fe(II)を流入させ、As(III)のAs(V)への連続酸化と Fe による As 共沈除去について検討した。その結果、流入 As(III)濃度が 0.5 mg/L の場合、流入 Fe(II)濃度が 5 mg/L では、42 日目以降平均 84.2%, 流入 Fe(II)濃度が 25 mg/L では、33 日目以降最大 100%, 平均 95.1% の As を除去することができ、As の水道水質基準値である 0.01 mg/L 付近まで除去することができた。

今後、環境条件（流入 Fe(II)濃度、水温、滞留時間など）を変更して連続除去実験を行う予定である。

謝辞：本研究の一部は、基盤研究(B)23360230 の助成を受けたものである。また、本研究に用いたスポンジ担体は東北大学大学院教授の原田秀樹先生よりご提供頂いた。感謝申し上げます。

参考文献

- 1) Chakraborti D., Rahman M. M., Das B., Murrill M., Dey S., Mukherjee S. C., Dhar R. K., Biswas B. K., Chowdhury U. K., Roy S., Sorif S., Selim M., Rahman M. and Quamruzzaman Q. : Status of groundwater arsenic contamination in Bangladesh: a 14-year study report, *Water Res.*, Vol.44, No. 19, pp.5789-5802, 2010.
- 2) Roychowdhury T. : Groundwater arsenic contamination in one of the 107 arsenic-affected blocks in West Bengal, India : Status, distribution, health effects and factors responsible for arsenic poisoning, *Int. J. Hyg. Envir. Heal.*, Vol.213, No.6, pp.414-427, 2010.
- 3) Yang L., Li X., Chu Z., Ren Y. and Zhang J. : Distribution and genetic diversity of the microorganisms in the biofilter for the simultaneous removal of arsenic, iron and manganese from simulated groundwater, *Bioresource Technol.*, Vol.156, pp. 384-388, 2014.
- 4) Kim M. J. and Nriagu J. : Oxidation of arsenite in groundwater using ozone and oxygen, *Sci. Total Environ.*, Vol.247, No. 1, pp.71-79, 2000.
- 5) Dey M., Williams K. and Coulton R. : Treatment of arsenic rich waters by the HDS process, *J. Geochem. Explor.*, Vol.100, No.2-3, pp.160-162, 2009.
- 6) Sorlini S. and Gialdini F. : Conventional oxidation treatments for the removal of arsenic with chlorine dioxide, hypochlorite, potassium permanganate and monochloramine, *Water Res.*, Vol.44, No.19, pp.5653-5659, 2010.
- 7) Michon J., Dagot C., Deluchat V., Dictor M. C., Battaglia-Brunet F. and Baudu M. : As(III) biological oxidation by CAsO1 consortium in fixed-bed reactors, *Process Biochem.*, Vol.45, No.2, pp.171-178, 2010.
- 8) Wan J., Klein J., Simon S., Joulain C., Dictor M. C., Deluchat V. and Dagot C. : As^{III} oxidation by *Thiomonas arsenivorans* in up-flow fixed-bed reactors coupled to As sequestration onto zero-valent iron-coated sand,

- Water Res.*, Vol.44, No.17, pp.5098-5108, 2010.
- 9) 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, *App. Environ. Microbiol.*, Vol.66, No.1, pp.92-97, 2000.
 - 10) 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, 土木学会論文集 G (環境), Vol.69, No.7, pp.III1-III8, 2013.
 - 11) 中村将一郎, 田村英輔, 谷川大輔, 長野晃弘, 山口隆司 : DHS リアクターを用いたトルエンガスの連続処理特性, 土木学会論文集 G(環境), Vol.68, No.7, pp.595-601, 2012.
 - 12) 酒井徹志, 井上嘉則 : LC-ICP-MS による陰イオン性ヒ素の化学別定量における分離条件の最適化, 工業用水, 第 481 号, pp.14-20, 1998.
 - 13) 日本分析化学会北海道支部 : 水の分析 (第 4 版) , pp.185-189, 化学同人, 1996.
 - 14) Weeger W., Lievermont 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, pp.141-149, 1999.
 - 15) 榎あや, 奥山加代子, 中村寛治 : 特定細菌放出に伴う土着細菌群集への影響 : 評価手法の検討, 環境工学研究論文集, Vol.45, pp.203-210, 2008.
 - 16) 中村寛治, 根本工, 高橋正訓, 千葉彩輝, 橋浦康範 : 広瀬川河川中に生息する細菌群集の季節変動の周期性と夏期出現優占種, 環境工学研究論文集, Vol.45, pp.521-528, 2009.
 - 17) Pokhrel D. and Viraraghavan T. : Biological filtration for removal of arsenic from drinking water, *J. Environ. Manage.*, Vol.90, No.5, pp.1956-1961, 2009.
 - 18) Mukherjee A. and Fryar A. E. : Deeper groundwater chemistry and geochemical modeling of the arsenic affected western Bengal basin, West Bengal, India, *Appl. Geochem.*, Vol.23, No.4, pp.863-894, 2008.
 - 19) Kowalchuk G. A. and Stephen J. R. : Ammonia-oxidizing bacteria: a model for molecular microbial ecology, *Annu. Rev. Microbiol.*, Vol.55, pp.485-529, 2001.
 - 20) <http://www.genoscope.cns.fr/spip/-http://www.genoscope.cns.fr/spip/-Rhizobium-sp-NT-26,534-.html#nb1-NT-26,534-.html#nb1>.
 - 21) Albuquerque L., Rainey F. A., Nobre M. F. and da Costa M. S. : *Hydrothalea sandarakina* sp. nov., isolated from a hot spring runoff, and emended descriptions of the genus *Hydrothalea* and the species *Hydrothalea flava*, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, Vol.62, pp.1603-1608, 2012.
 - 22) Zhang Y., Ma Y. F., Qi S. W., Meng B., Chaudhry M. T., Liu S. Q. and Liu S. J. : Responses to arsenate stress by *Comamonas* sp. strain CNB-1 at genetic and proteomic levels, *Microbiology*, Vol.153, pp.3713-3721, 2007.

(2014. 5. 23 受付)

CONTINUOUS REMOVAL OF ARSENIC USING A DHS REACTOR WITH ARSENITE-OXIDIZING BACTERIA

Nami SEGAWA, Kento KANNO, Nao ISHIKAWA,
Ayumi ITO, Kanji NAKAMURA, and Teruyuki UMITA

The health impairment caused by ingestion of the arsenic in groundwater is serious especially in Asian areas. Ferrous iron (Fe (II)) is detected in groundwater with arsenic. In order to improve the efficiency of coagulation or adsorption process for arsenic removal, arsenite (As (III)) which is a predominant form in groundwater needs to be oxidized to arsenate (As (V)) as a pretreatment. In this research, arsenite-oxidizing bacteria are enriched from activated sludge, then 16S rRNA gene analysis was conducted. Arsenite oxidation characteristics under different culture conditions (DO, pH, and temperature) were examined and the optimum conditions of pH and temperature were 7 and 30°C, respectively. For the purpose of developing an economical arsenic removal method without an aeration equipment, an oxidizer, and a flocculant, a Down-Flow Hanging Sponge (DHS) reactor with fixed arsenite-oxidizing bacteria was examined. As a result, when the inflow concentrations of As (III) and Fe(II) 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.

See discussions, stats, and author profiles for this publication at: <https://www.researchgate.net/publication/276492214>

CONTINUOUS REMOVAL OF ARSENIC USING A DHS REACTOR WITH ARSENITE-OXIDIZING BACTERIA

Article · January 2014

DOI: 10.2208/jscej.70.III_535

CITATIONS

0

READS

103

6 authors, including:



[Nao Ishikawa](#)

Iwate University

44 PUBLICATIONS 295 CITATIONS

[SEE PROFILE](#)



[Ayumi Ito](#)

Iwate University

45 PUBLICATIONS 335 CITATIONS

[SEE PROFILE](#)



[Teruyuki Umita](#)

Iwate University

59 PUBLICATIONS 442 CITATIONS

[SEE PROFILE](#)