



Title	微小電極を用いた河床生物膜内の硝化反応の検討
Author(s)	小野, 英樹; 工藤, 良則; 中川, 融 他
Description	第8回衛生工学シンポジウム (平成12年11月16日 (木) -17日 (金) 北海道大学学術交流会館) . 2 環境 保全・リスク環境 . P2-6
Citation	衛生工学シンポジウム論文集, 8, 94-99
Issue Date	2000-11-01
Doc URL	<a href="https://hdl.handle.net/2115/7214">https://hdl.handle.net/2115/7214</a>
Type	departmental bulletin paper
File Information	8-2-6_p94-99.pdf



## 2-6

# 微小電極を用いた河床生物膜内の硝化反応の検討

小野英樹、工藤良則、中川融、中村吉志、増子友昭、佐藤 久 (八戸工業大学)

### 1. はじめに

水域では自然浄化作用と呼ばれる、人為的な手法によらず自然水の中で汚濁物質が減少に向かう作用が見られる<sup>1)</sup>。自然浄化作用はあらゆる水域(河川、湖沼、海洋、土壌、等)に見られるが、研究対象として最も多く取り上げられているのは河川である。これは、河川に見られる水の流下に伴って汚濁物質濃度が減少し溶存酸素(O<sub>2</sub>)が回復する現象が自浄作用の典型と見なされてきた背景によると考えられる。

河川に排出された物質はその流下過程で混合、拡散、吸着、沈殿、巻き上げ、生物学的分解、溶出、等の様々な物理学的、化学的、および生物学的な作用を受けて量的および質的に変化する。自浄作用に寄与するこれらの因子のうち、有機物質の炭酸ガスへの変換や窒素化合物の窒素ガスへの変換といった生物学的分解のみが河川内の汚濁物質量の減少に寄与するため、真の自浄作用と呼ばれている。これに対し、他の物理学的および化学的な作用は水中の濃度は、低下するものの河床等の濃度は増加するので水域全体の総量に変化はなく、見かけの自浄作用と呼ばれる。

人為的汚濁が進行した河川においては、有機物質に加えアンモニア態窒素(NH<sub>4</sub><sup>+</sup>)に関する考察が必要である。NH<sub>4</sub><sup>+</sup>は生物にとって有害であり、河川中のO<sub>2</sub>を消費し、閉鎖性水域では富栄養化を引き起こす。河川に流入したNH<sub>4</sub><sup>+</sup>はアンモニア酸化細菌によって亜硝酸(NO<sub>2</sub><sup>-</sup>)に酸化された後、亜硝酸酸化細菌によって硝酸(NO<sub>3</sub><sup>-</sup>)にまで酸化される。硝化細菌は増殖速度が遅いため、浮遊性の硝化細菌は河川水質に影響を及ぼすほどに増殖し現存することはなく、主に付着性および底質中の硝化細菌が自浄作用に貢献していると考えられている<sup>1)</sup>。また、NH<sub>4</sub><sup>+</sup>が酸化されただけでは浄化されたとはいえず、硝化反応で生

成されたNO<sub>2</sub><sup>-</sup>またはNO<sub>3</sub><sup>-</sup>が脱窒反応により窒素ガスに変換されてはじめて底質を含めた河川中から除去されたことになる。脱窒反応は無酸素条件下で生ずるため、脱窒反応に関しても付着性および底質中の細菌が窒素化合物の除去には重要な役割を演ずる。

以上の背景を考慮し、本研究では青森県八戸市内を流れる新井田川河川水中の窒素化合物濃度を把握し、河床生物膜がこれらの浄化作用に果たす役割を明らかにすることを目的とした。しかしながら、河床生物膜の厚さは数mmと極めて薄いため、生物膜の解析は極めて困難である。そこで本研究では、微小電極を用いて生物膜内の無機窒素化合物濃度を測定した。微小電極は先端直径が僅か数μmのセンサーであり生物膜の解析に先立ちいかなる前処理も必要としないため、生物膜内の原位置(*in situ*)における微生物の活性を、生物膜内の微生物の生態学的構造や基質濃度分布の攪乱を最小限に留め、直接定量することが可能である。既往の研究において、下水処理に用いられる生物膜内の無機窒素化合物濃度が測定されている<sup>2-7)</sup>。しかしながら、河床生物膜内を解析した研究例は比較的少ない<sup>8)</sup>。

### 2. 実験装置および実験方法

#### 2.1 河川水質の測定

本研究では青森県八戸市内を流れる新井田川の下流の風張橋付近に注目した。風張橋の約100m上流の地点には是川污水处理場の処理水放水口が存在する。河川水試料は放水口の約30m下流(point1)、風張橋直下(point2)、および風張橋の約100m下流(point3)の3地点において採水した。採水は6月7日から8月1日まで、週に2回、晴天時の午前10時から正午までの間とした。水質測定項目はアンモニア(NH<sub>4</sub><sup>+</sup>)、亜硝酸(NO<sub>2</sub><sup>-</sup>)、硝酸(NO<sub>3</sub><sup>-</sup>)、溶存性有機体窒素(DOC)、紫外部(波長260nm)吸光度(E260)

、 $O_2$ 、pH、水温とした。 $NH_4^+$ はインドフェノール青法<sup>9)</sup>により、 $NO_2^-$ および $NO_3^-$ は陰イオン分析用カラム(Shim-pack IC-A1: Shimadzu)を装備したイオンクロマトグラフ(HIC-6A: Shimadzu)により、DOCは全有機炭素分析装置(TOC-5000: Shimadzu)により、E260は分光光度計により、 $O_2$ はDOメーターにより、pHおよび水温はpHメーターにより、それぞれ測定した。

## 2.2 回分試験

5月31日から6月8日の間に上記の各水質試料採取地点から河床礫を採取し、河川水を満たした密閉容器に入れた後、直ちに実験室に持ち帰った。実験室到着直後0.65Lの培地内に河床礫を整置させた。回分試験に用いた培地の組成は $NH_4Cl=300\mu M$ 、 $NaNO_2=100\mu M$ 、 $NaNO_3=300\mu M$ 、 $Na_2HPO_4=570\mu M$ 、 $MgCl_2 \cdot 6H_2O=84\mu M$ 、 $CaCl_2=200\mu M$ 、および $EDTA \cdot 2Na=270\mu M$ とし、pHは8.0に調整した。培地内に河床礫を整置した時点を試験開始とし、その後約20時間に渡り10回程度培地の $NH_4^+$ 、 $NO_2^-$ 、および $NO_3^-$ 濃度を測定した。測定結果より生物膜単位面積当たりの基質消費速度( $J[\mu mol/cm^2/h]$ )を算出した。

## 2.3 微小電極を用いた生物膜内基質濃度分布の測定

生物膜内基質濃度分布を測定するため、本研究室において $O_2$ 、 $NH_4^+$ 、 $NO_2^-$ 、 $NO_3^-$ 、およびpH微小電極を製作した。回分試験と同様に採取した河床礫を測定用培地(組成; $NH_4Cl=300\mu M$ 、 $NaNO_2=100\mu M$ 、 $NaNO_3=300\mu M$ 、 $Na_2HPO_4=2,100\mu M$ 、 $MgCl_2 \cdot 6H_2O=84\mu M$ 、 $CaCl_2=200\mu M$ 、および $EDTA \cdot 2Na=270\mu M$ とし、pHは7.5に調整)を満たしたフローセル(容積;約3.5L)内に整置させた。測定中は培地をスターラーで攪拌し、約2cm/sの膜面流速を与えた。微小電極はマイクロマニピュレーター(MMスタンダードZ昇降ステージMM-60V-H1およびX・YステージMM-60X・Y-H1: 中央精機株式会社)に固定し、コントローラドライバ(CAT-D: 中央精機株式会社)により制御した。 $O_2$ 微小電極は比較電極に対して-0.75Vの電圧をかけピコアンペアメーター(DIGITAL PICOAMMETER AM-271A

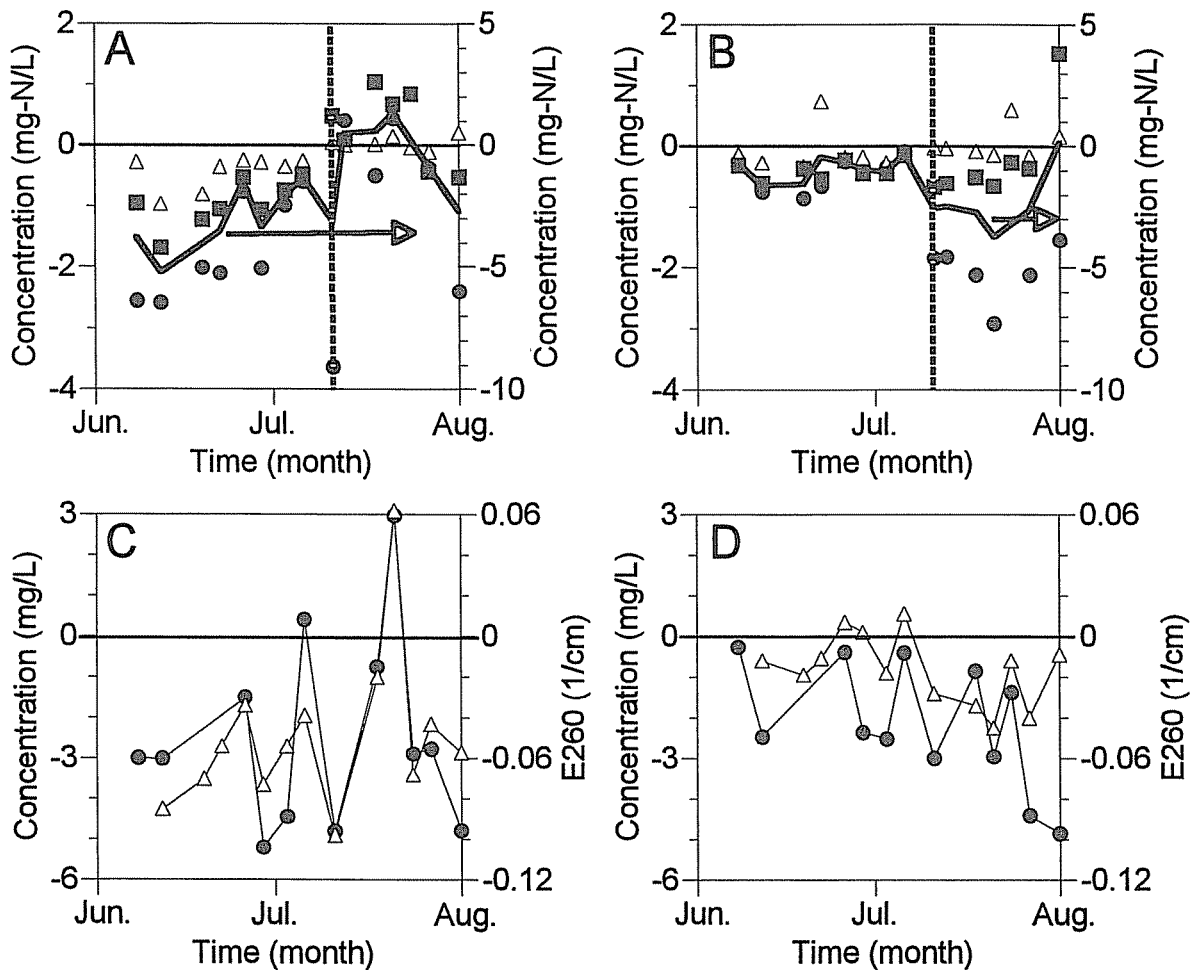
: TOA)に、 $NH_4^+$ 、 $NO_2^-$ 、 $NO_3^-$ 、およびpH微小電極は直接電圧計(pH/ION METER F-23: HORIBA)に接続した。比較電極には銀-塩化銀タイプ(2080A-06T: HORIBA)を用いた。測定用基質の水温を $25 \pm 1^\circ C$ に保ち全ての測定を行った。

測定した濃度分布から、生物膜単位面積当たりの基質消費速度( $J[\mu mol/cm^2/h]$ )を、生物膜と液本体間に存在する濃度拡散層内の基質濃度分布を濃度勾配として、Fickの拡散方程式から算出した<sup>5)</sup>。さらに、測定した濃度分布より生物膜単位体積当たりの基質消費活性( $R[\mu mol/cm^3/h]$ )の分布を算出した<sup>5)</sup>。

## 3. 結果と考察

### 3.1 河川の流下に伴う河川水水質の変動

Fig. 1に2000年6月1日から8月1日にかけての3測定地点間の物質増加濃度の経日変化を示した。Fig. 1Aにはpoint1からpoint2の間、Fig. 1Bにはpoint2からpoint3の間、無機窒素化合物( $NH_4^+$ 、 $NO_2^-$ 、 $NO_3^-$ (左軸)、および3態窒素(右軸))の増加濃度の経日変化を示した。6月1日から7月11日までの間、point1において $NH_4^+$ 、 $NO_2^-$ 、および $NO_3^-$ の平均濃度(標準偏差)はそれぞれ2.8(1.4)mg-N/L、0.7(1.1)mg-N/L、2.3(0.9)mg-N/Lであった。point1において $O_2$ 濃度は9.5(0.8)mg/Lであった。放水口から約30m上流の地点においても同様に河川水質を測定したところ、 $NH_4^+$ は検出限界値以下、 $NO_2^- = 0.1(0.1)mg-N/L$ 、 $NO_3^- = 1.3(0.3)mg-N/L$ であった。これらの結果から、是川污水处理場放流水が河川への無機窒素化合物の負荷となっていることがわかった。流入した $NH_4^+$ はpoint1からpoint2の間で約70%減少した。従って、point1の下流の僅か70m程度の流域が主に $NH_4^+$ の減少に貢献していたことが明らかとなった。 $NO_2^-$ および $NO_3^-$ はpoint1からpoint2の間でともに減少していた。Fig. 1Cに示したように、この間でDOC濃度が減少したことから、河川水中の $NO_2^-$ および $NO_3^-$ に加えて、 $NH_4^+$ の減少に伴い生成し



**Fig.1** The time evolution of increasing concentrations; ammonium (●), nitrite (△), nitrate (■), and inorganic nitrogen compounds defined as the sum of ammonium, nitrite, and nitrate (line) between point1 and point2 (A), and between point2 and point3 (B). Panel C and D showed DOC (●) and E260 (△) between point1 and point2 (C), and between point2 and point3 (D).

た $\text{NO}_2^-$ および $\text{NO}_3^-$ が脱窒反応により河川水から除去されたと考えられる。河川水中の無機窒素化合物濃度が減少する理由として、硝化・脱窒反応の他に同化作用による有機体窒素への変換が考えられる。また流入河川および降雨による希釈が考えられるが、point1からpoint3の間には流入河川はなく、河川水質の測定を晴天時に行ったことからこれらの要因は無視できると考えられる。

Fig. 1CおよびFig. 1Dには有機物濃度の指標としてDOCおよびE260の変動の経日変化を示した。無機窒素化合物と同様に、Fig. 1Cにはpoint1からpoint2の間の、Fig.

1Dにはpoint2からpoint3の間の増加濃度の経日変化を示した。有機物濃度はpoint1からpoint2の間のみならずpoint2からpoint3の間においても減少した。有機物濃度の減少傾向が $\text{NH}_4^+$ のそれと異なったのは、有機物濃度の減少が分解による無機化のみならずE260に代表されるような生物難分解性の有機物の物理的吸着や沈殿によるものであり、 $\text{NH}_4^+$ の様に短期間には完全に無機化されなかったためと考えられる。

7月11日以降、point1からpoint2の間で無機窒素化合物は減少せず、point2からpoint3の間で $\text{NH}_4^+$ が減少した。 $\text{NH}_4^+$ の減少に伴う $\text{NO}_2^-$ および $\text{NO}_3^-$ の増加は検出され

なかった。7月11日以降降雨により河川水量が増水し、point1付近には河床生物膜は見られなくなった。このことがpoint1からpoint2の間で無機窒素化合物が減少しなかった一因と考えられたが、本研究では理由を明確にできなかつたため今後の検討課題である。

### 3.2 河床生物膜の無機窒素化合物消費速度

上記の3地点の河床生物膜の窒素化合物消費速度を解析するため回分試験を行った。試験開始から約20時間の間では $\text{NH}_4^+$ 、 $\text{NO}_2^-$ 、および $\text{NO}_3^-$ 濃度は時間に比例して変動したことから、各基質の消費反応が0次反応であったことがわかった。これらの結果から、河床礫単位面積当たりの基質消費速度( $J[\mu\text{mol}/\text{cm}^2/\text{h}]$ )を算出した。point1、point2、およびpoint3の生物膜の $J(\text{NH}_4^+)$ 、 $J(\text{NO}_2^-)$ 、および $J(\text{NO}_3^-)$ をTable1に示した。全地点において $\text{NH}_4^+$ が消費され、point1では $\text{NO}_2^-$ の生成が、point2およびpoint3では $\text{NO}_3^-$ の生成が見られたことから、河床生物膜内において硝化反応が生じていたことが伺える。生物膜採取地点別に比較すると、 $J(\text{NH}_4^+)$ は河川水中の $\text{NH}_4^+$ 濃度が最も高かつたpoint1よりもむしろpoint2において高かつた。さらに、河川水中に $\text{NH}_4^+$ が検出されなかつたpoint3においても $\text{NH}_4^+$ の消費が認められた。以上の結果から、通常 $\text{NH}_4^+$ 負荷のない地点に存在する生物膜内にも硝化細菌が存在し、河川水中の $\text{NH}_4^+$ の減少に貢献することが明らかとなった。これら硝化細菌は低水温期や高濃度の $\text{NH}_4^+$ 流入時に浄化作用に貢献するものと考えられる。

3態窒素(inorganic N)も全地点で消費されたことから、河床生物膜が河川水中の無機窒素化合物の減少にある程度貢献することが明らかとなった。無機窒素化合物が減少する反応として硝化・脱窒反応および窒素同化反応が考えられる。point1およびpoint2は、point3に比べて $J(\text{inorganic N})$ が高かつた。この理由として、処理場の放水口に近いほど有機物濃度が高く生物膜が厚かつたため、脱窒反応が起こる無酸素領域が生物膜内に形成され易かつたことや、微生物量が多く窒素同化反応が活発であつたことが考えられる。

point1においてのみ $\text{NO}_2^-$ の生物膜外への放出が認められた。 $\text{NO}_2^-$ は硝化反応および脱窒反応の中間生成物であり環境中で検出されることはまれであるが、 $\text{NO}_2^-$ は急激な $\text{O}_2$ の低下や有機物濃度の上昇時に蓄積することが報告されている。本研究でも河川水中に $\text{NO}_2^-$ が検出されることはまれであつたが、環境中の高濃度の $\text{NO}_2^-$ は水生生物にとって有害であり温室効果ガスである亜酸化窒素の生成を促進することが知られている<sup>10)</sup>。

### 3.3 河床生物膜内の無機窒素化合物濃度分布

生物膜内の無機窒素化合物に関する反応をより詳細に検討するため、各種微小電極を用いてpoint1から採取した生物膜内の無機窒素化合物濃度分布を測定した。Fig. 2Aに典型的な生物膜内基質濃度分布を示した。この地点の河川水は生物易分解性有機物を含んでいたので、生物膜厚は約4,000 $\mu\text{m}$ に達していた。しかしながら、 $\text{O}_2$ は表面から僅か1,100 $\mu\text{m}$ の地点で枯渇し

**Table1** A summary of the fluxes of ammonium, nitrite, nitrate, and inorganic nitrogen compound into the biofilms.

	J(ammonium)	J(nitrite)	J(nitrate)	J(inorganic N.)
point1	0.021	-0.009	0.002	0.015
point2	0.029	0	-0.014	0.014
point3	0.017	0	-0.014	0.003

ており、生物膜の70%以上が無酸素条件下にあった。光合成による $O_2$ の増大は検出されなかった。 $NH_4^+$ には膜深さ方向に著しい濃度の変動は見られなかった。これに対し、 $NO_2^-$ および $NO_3^-$ 濃度は深さ約300 $\mu m$ の地点以深から膜深さ方向に減少した。

窒素化合物の減少が顕著であった領域を検討するため、実測の基質濃度分布 (Fig. 2A) を基に生物膜単位体積当たりの基質消費速度 ( $R[\mu mol/cm^3/h]$ ) を算出した。Fig. 2Bに $NO_3^-$ についての $R(R(NO_3^-))$ の膜深さ方向分布を示した。表面から深さ約500 $\mu m$ の領域は $R(NO_3^-)$ が負であったのに対し、これ以深では正に転じた。この結果より、 $NO_3^-$ の減少が深さ500 $\mu m$ 以深の領域において顕著であることがわかった。無機窒素化合物のうち最も減少したのが $NO_3^-$ であり、減少が膜表面ではなく $O_2$ 濃度が約30 $\mu M$ 以下の微好気領域で顕著であったことから、窒素同化反応に比べ脱窒反応が生物膜内における窒素化合物の減少に貢献していたことが明らかとなった。微小電極測定用の培地には有機物は

含まれていないが、生物膜深層の嫌気領域で生成された有機物や還元性物質、および生物膜内の細胞外高分子が電子供与体となり脱窒反応が生じたと考えられる。

Fig. 2Bの結果から、表面から深さ約500 $\mu m$ の領域で $NO_3^-$ が生成していることがわかった。この領域が好氣的であり僅かではあるものの $NH_4^+$ および $NO_2^-$ が減少していることから、硝化反応が生じていたことが明らかとなった。以上の結果から、河床生物膜内では硝化・脱窒同時反応が生じていたことが明らかとなった。この生物膜は $O_2$ 、 $NH_4^+$ 、 $NO_3^-$ 、およびDOC濃度の比較的高い環境に存在していたため、このように硝化・脱窒反応が容易に生じたものと考えられる。

生物膜表面に存在する濃度境界層内の濃度勾配をFig. 2Aから算出し、これを基に生物膜単位面積当たりの基質消費速度 ( $J[\mu mol/cm^2/h]$ ) を算出した。 $J(NH_4^+)$ は0.014 $\mu mol/cm^2/h$ であり、回分試験から算出した $J(NH_4^+)$ と同程度であった。これに対し、 $J(NO_2^-)$ と $J(NO_3^-)$ はそれぞれ0.018 $\mu mol/cm^2/h$ および0.012 $\mu mol/cm^2/h$ で

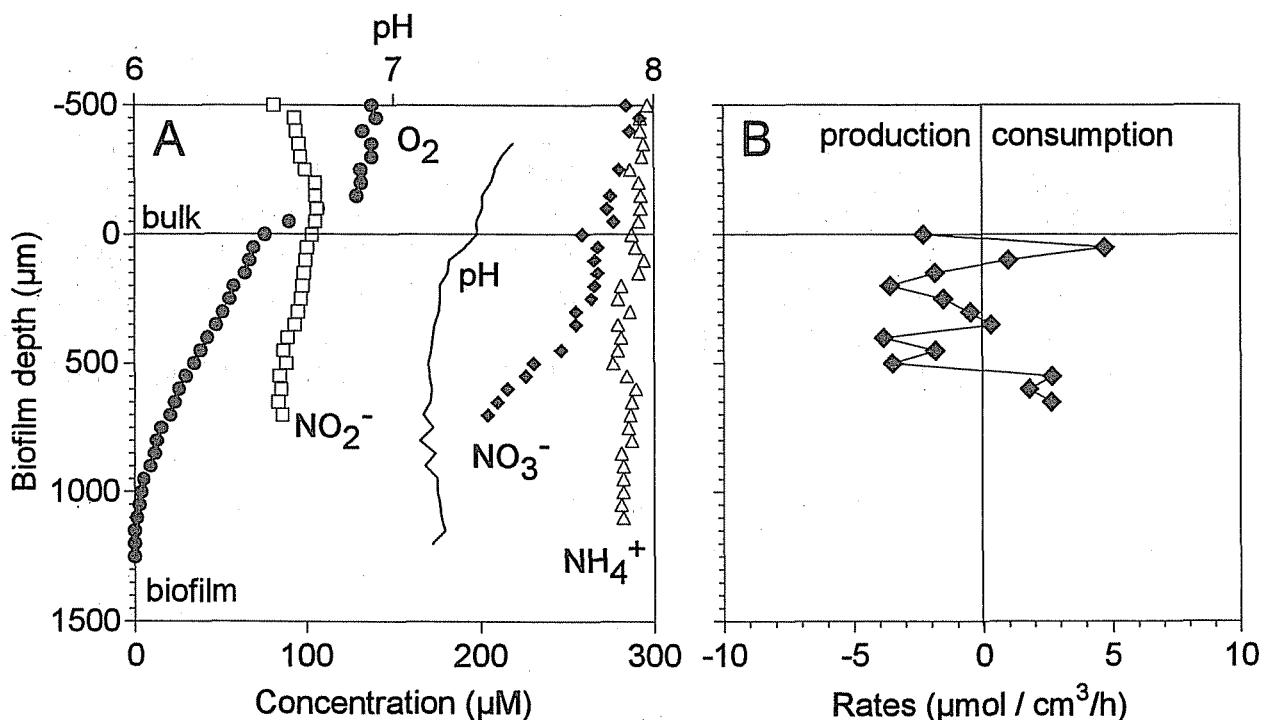


Fig.2 Typical steady-state concentration profiles of dissolved oxygen (●), ammonium (△), nitrite (□), nitrate (◆), and pH (line) (A), and the spatial distributions of nitrate production rates (B) in the biofilm from Niida River. Surface is at a depth of 0 $\mu m$ .

あり、共に回分試験の $J(\text{NO}_2^-)$ および $J(\text{NO}_3^-)$ よりも高かった。目測ではあるが明らかに微小電極の測定に供した生物膜は回分試験に供した生物膜よりも厚かったことから、生物膜内に嫌気部分がより多く存在し、脱窒活性が高かったものと推測される。生物膜への物質輸送は膜表面の流速に依存する。微小電極測定時および回分試験時の膜面流速は約2cm/sで河川の流速に比べ著しく低かった。このことは、河川水内の条件下では生物膜内により多くの $\text{O}_2$ および基質が浸透している可能性を示唆している。従って、実際の生物膜単位面積当たりの基質消費速度は上記の値より高く、生物膜の窒素除去作用への貢献度はさらに高かったと考えられる。

#### 4. 結論

本研究では、青森県八戸市内を流れる新井田川の風張橋付近の河川水質を経日的に測定した。また、この区間での河床生物膜の窒素化合物変換能を解析するため回分試験を行った。さらに、 $\text{O}_2$ 、 $\text{NH}_4^+$ 、 $\text{NO}_2^-$ 、 $\text{NO}_3^-$ 、およびpH微小電極を河床生物膜に適用し、生物膜内の基質濃度分布を測定した。汚水処理場の処理水放水口付近の河川水中の平均 $\text{NH}_4^+$ 、 $\text{NO}_2^-$ 、 $\text{NO}_3^-$ 濃度はそれぞれ2.8mg-N/L、0.7mg-N/L、2.3mg-N/Lであり、汚水処理場からの放流水がこれら無機窒素化合物負荷の要因となっていることがわかった。河床生物膜には硝化活性および脱窒活性が認められ、 $\text{NH}_4^+$ 消費速度は $0.02\mu\text{mol}/\text{cm}^2/\text{h}$ 、3態窒素消費速度は $0.015\mu\text{mol}/\text{cm}^2/\text{h}$ であった。 $\text{O}_2$ は厚さ4,000 $\mu\text{m}$ 程度の生物膜の表面から僅か1,500 $\mu\text{m}$ の地点で枯渇していた。硝化反応は生物膜の表層に検出され、好気領域の深部には検出されなかった。脱窒活性は微好気領域および無酸素領域に検出された。本研究の結果から、河床生物膜が新井田川の無機窒素化合物の浄化作用にある程度貢献していることが明らかとなった。

#### 5. 参考文献

- 1) 宗宮功編(1990) 自然の浄化機構、技報堂出版。
- 2) Satoh, H., Okabe, S., Norimatsu, N., and Watanabe, Y. (2000) Significance of substrate C/N ratio on structure and activity of nitrifying biofilms determined by in situ hybridization and the use of microelectrodes, *Wat. Sci. Tech.*, in press.
- 3) Okabe, S., Itoh, T., Satoh, H., and Watanabe, Y. (1999) Analyses of spatial distribution of sulfate-reducing bacteria and their activity in aerobic wastewater biofilms, *Appl. Environ. Microbiol.*, **65**(11), 5107-5116.
- 4) 佐藤 久、岡部 聡、渡辺義公(1999) 微小電極およびFISH法を用いた生物膜内アンモニア酸化細菌菌体密度分布および活性分布に及ぼす流入基質C/N比の影響評価、水環境学会誌、**22**(9)、763-769.
- 5) Okabe, S., Satoh, H., and Watanabe, Y. (1999) In situ analysis of nitrifying biofilms as determined by in situ hybridization and the use of microelectrodes, *Appl. Environ. Microbiol.*, **65**(7), 3182-3191.
- 6) 佐藤 久、岡部 聡、渡辺義公(1999) 微小電極及びFISH法を用いた都市下水生物膜内のアンモニア酸化機構の検討、水環境学会誌、**22**(3)、206-214.
- 7) 佐藤 久、岡部 聡、伊藤 司、渡辺義公(1998) 微小電極を用いた微好気性生物膜内の硫酸塩還元反応の検討、水環境学会誌、**21**(6)、367-375.
- 8) Revsbech, N. P. and Sorensen, J. (1990) Denitrification in soil and sediment, Plenum press, New York and London.
- 9) 日本分析化学会北海道支部編(1981) 水の分析(第3版)、化学同人、210-214.
- 10) de Beer, D., Schramm, A., Santegoeds, C. M., and Kuhl, M. (1997) A nitrite microsensor for profiling environmental biofilms, *Appl. Environ. Microbiol.*, **63**(3), 973-977.