

# 河川源流域における 硝化細菌群の生息に影響を及ぼす要因

ENVIRONMENTAL FACTORS AFFECTING  
NITRIFIER INHABITATION IN A RIVERHEAD AREA

藤田昌史<sup>1</sup>・吉野宏美<sup>2</sup>・芳賀弘和<sup>3</sup>・西田継<sup>4</sup>・坂本康<sup>5</sup>  
Masafumi FUJITA, Hiromi YOSHINO, Hirokazu HAGA,  
Kei NISHIDA and Yasushi SAKAMOTO

<sup>1</sup>正会員 博(工) 山梨大学助手 大学院医学工学総合研究部 (〒400-8511 山梨県甲府市武田4-3-11)

<sup>2</sup>豊橋技術科学大学修士課程 大学院工学研究科 (〒441-8580 愛知県豊橋市天伯町雲雀ヶ丘1-1)

<sup>3</sup>博(農) 山梨大学21世紀COE研究員 大学院医学工学総合研究部 (〒400-8511 山梨県甲府市武田4-3-11)

<sup>4</sup>博(工) 山梨大学助教授 大学院医学工学総合研究部 (〒400-8511 山梨県甲府市武田4-3-11)

<sup>5</sup>正会員 工博 山梨大学教授 大学院医学工学総合研究部 (〒400-8511 山梨県甲府市武田4-3-11)

The habitat distribution of nitrifier in a riverhead area was kinetically examined by nitrification activity batch test using sampled soil. The kinetic estimation showed that the soil with higher carbon content had lower nitrifier content. On the other hand, the soil with higher carbon content possessed higher content of ubiquinone which was an indicator of aerobes. Nitrate was not detected in the soil with higher carbon content, while it existed in hillslope whose soil had lower carbon content. Therefore, it was inferred that the competition of oxygen between heterotrophs and nitrifier occurred. Since nitrifier had lower growth rate than heterotrophs, nitrifier was presumably difficult to survive in the soil with higher carbon content.

**Key Words :** dissolved oxygen, inhabitation, nitrifier, quinone, riverhead area, soil

## 1. はじめに

多くの開発途上国では、生活廃水等を未処理のまま河川に放流している現状にある。人口増加が進むなかで、今後、ますます河川の水質浄化機能に依存することになるのは、容易に予想される。

河川の自浄作用<sup>1)</sup>ということばが使われるようになって久しいが、人間活動の影響を受けたことにより、後天的に発現した水質浄化機能も自浄作用として解釈している場合がある。言い換えると、本来河川が有している水質浄化機能を過大評価している可能性がある。その意味では、河川の水質浄化機能を正しく見積もる必要がある。つまり、河川が先天的に有している機能と後天的に形成された機能とを分けて評価することが必要になると考えられる。

河川の先天的な水質浄化機能を見積もるためには、自然河川の水質浄化機能の形成過程を調べるのが有効で

あるが、そのためには、水質浄化を担う細菌群の河川源流域での生息分布、河川への流出機構、そして河川内での水質浄化機能の発現過程などについて明らかにする必要がある。

過去に斜面流出水に含まれる細菌群集を調べたところ、地下水位や流出水量に応じて、細菌群集の量や組成は多様に変化することが明らかとなった<sup>2),3)</sup>。言い換えると、さまざまな水文条件により、斜面土壌から多様な細菌群集が河川に供給され得ることを示している。ただし、細菌群の河川への流出という観点では、斜面だけでなく、河川に至るまでの河畔域にも着目する必要がある。

本研究では、上述した一連の研究の手始めとして、水質浄化機能のなかでも硝化に着目し、河川源流域における斜面とそこから主流路に至るまでの河畔域において、土壌中の硝化細菌群の生息分布を動力学的に調べた。また、その生息に及ぼす環境要因についても検討した。

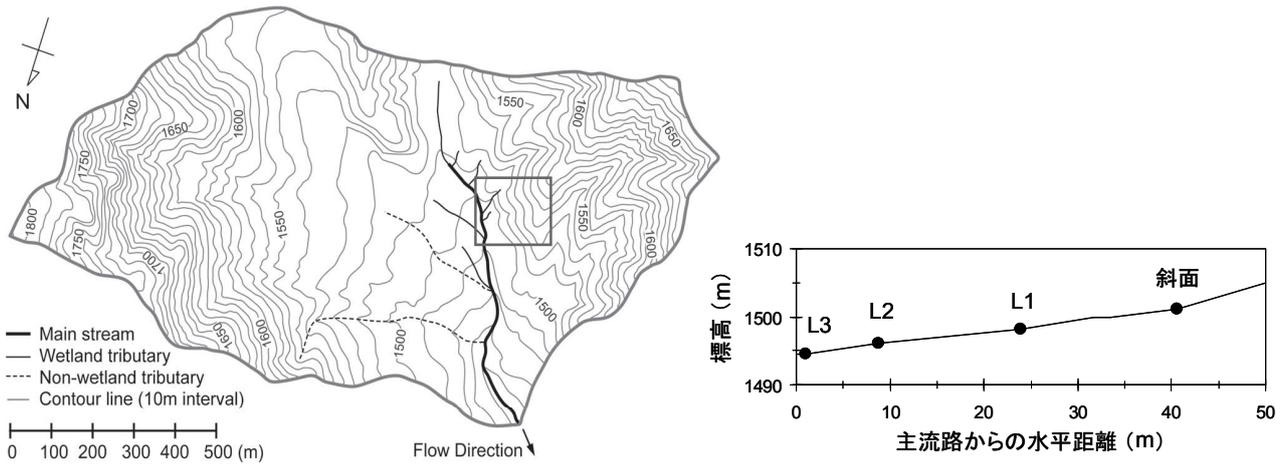


図-1 調査地

## 2. 調査地

調査は、山梨県北杜市に位置する山梨県森林総合研究所の瑞牆山試験流域<sup>4)</sup>で行った(図-1)。主流路沿いには、河畔湿地が散在している。河畔湿地には、その背後にある斜面からの湧水が、河畔湿地の表面を通過して主流路へと至る流れがある。本研究では、図中に示したように、斜面とそこから主流路に至る河畔域の3地点(L1, L2, L3)、合計4地点を調査対象とした。L1, L2, L3では、表層の含水比が200%程度であったのに対し、斜面では50%程度であった。また、表層の透水係数は、L3では $1.96 \times 10^{-3}$  cm/secであったのに対し、斜面では $1.73 \times 10^{-2}$  cm/secであった。

## 3. 方法

### (1) 採土

各地点ともに、有効容積100mLのコアサンプラーを用いて、 $A_0$ 層を取り除いたところから深さ60cmまで、10cm間隔で採土した。そして、後述する土壤CN含有率や土壤キノン含有率の測定や硝化活性試験に供した。

### (2) 土壤中の炭素・窒素含有率

各地点の土壤中(0-10cm, 30-40cm)の炭素や窒素の含有率を調べるために、乾燥試料0.4gと酸化コバルト4gを混ぜて、CNコーダー(Yanako社, MT500)により分析した。

### (3) 土壤キノン含有率

#### a) 呼吸鎖キノン

呼吸鎖キノン(以下、キノン)とは、細菌の電子伝達鎖において水素キャリアーとして機能する補酵素である。好気呼吸を行う細菌が持つユビキノン(Q-n)、嫌気呼吸を行う細菌が持つメナキノン(MK-n ( $H_x$ ))に大別さ

れる。ここで、 $n$ ,  $H_x$ は、それぞれイソプレノイド側鎖数およびその水素飽和度 $x$ を表す<sup>5)</sup>。一般的に、一細菌種は一種類の優占キノン種を持つ。優占キノン種は、環境条件に応じて変化することがなく、遺伝的にも安定していることが知られている<sup>5)</sup>。また、キノン濃度は細菌群量と対応していることが報告されている<sup>5)</sup>。キノンは、微生物学的な専門知識を必要とせず化学分析だけで分析が可能であることや定量性に優れていることから、活性汚泥<sup>6)</sup>、農地土壌<sup>7)</sup>、干潟の底質<sup>8)</sup>などの複合微生物系や斜面流出過程<sup>2),3)</sup>の解析のためのバイオマーカーとして利用されてきている。

#### b) 分析方法

各地点の土壌(0-10cm, 30-40cm)を凍結乾燥処理した後、重量を測定した。前処理後のそれぞれの土壌からキノンを含む脂溶性成分を抽出するために、クロロホルム・メタノール溶液(2:1, v/v)とヘキサンを順次用いた。得られた溶媒抽出物を固相抽出カートリッジ(Waters社, Sep-Pak Plus Silica)に吸着させ、2% (v/v)のジエチルエーテル・ヘキサン溶液を用いてMKを、10% (v/v)の同溶液を用いてQを、それぞれ分離・精製した。アセトンに溶媒置換した後、フォトダイオードアレイ検出器(SHIMAZU社, SPD-M10A VP)付きの高速液体クロマトグラフィー(SHIMAZU社, SCL-10A VP)により、各キノン分子種を分離・定量した。各キノン種の同定には、吸光スペクトルやENIU値<sup>5)</sup>を参考にした。土壤キノン含有率は、凍結乾燥後の乾燥重量に対するものとした。

#### (4) 土壤中の硝化細菌群存在量の推定

##### a) 硝化活性試験

$\phi$  2mmのふるいを通過した土壤試料にBOD希釈液を加え、遠心分離した後、上澄み液を取り除く洗浄作業を2回繰り返した。そして、洗浄済みの土壤試料約40g(湿潤)を三角フラスコに入れた。BOD希釈液に塩化アンモニウム、重曹をそれぞれ20mg-N/L, 160mg/Lとなるよう

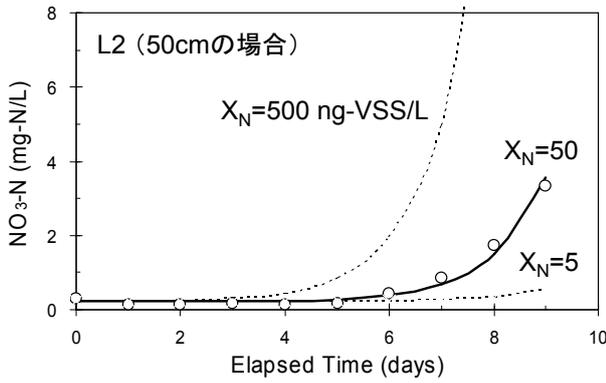


図-2 硝化活性試験における硝酸性窒素濃度の増加過程と硝化細菌群量の動力的推定

に添加した後、pHを7.0に調整した試験液300mLをこの三角フラスコに入れ、静置条件下で曝気した。すなわち、硝化に必要なアンモニア性窒素、溶存酸素、アルカリ度を十分に与えた。水温を20℃に設定した恒温水槽に水浴させ、24時間ごとに上澄み液を採取し、硝酸性窒素を硫酸ヒドラジニウム還元ナフチルエチレンジアミン法にて分析した。

#### b) 硝化細菌群量の動力的推定

硝化は、アンモニア性窒素から亜硝酸性窒素、そして亜硝酸性窒素から硝酸性窒素へと至る逐次反応であるが、前者はアンモニア酸化細菌群が、後者は亜硝酸酸化細菌群が関与することが知られている。それぞれについて、さまざまな反応速度式が提案されているが<sup>9),10)</sup>、ここでは簡略化するために、硝化をアンモニア性窒素から硝酸性窒素に至る一段階の反応と見なし、硝化細菌群の増殖速度と硝酸性窒素の生成速度をそれぞれ式(1)、(2)のように表現した。アンモニア酸化反応と亜硝酸酸化反応では前者が律速となることが知られていることから、このような一段階の反応速度を想定した場合、アンモニア酸化細菌群のパラメータが用いられている<sup>10)</sup>。

$$\frac{dX_N}{dt} = \mu_{\max} \frac{NH_4}{K_{NH_4} + NH_4} \frac{DO}{K_{DO} + DO} \frac{ALK}{K_{ALK} + ALK} X_N - bX_N \quad (1)$$

$$\frac{dNO_3}{dt} = \frac{\mu_{\max}}{Y} \frac{NH_4}{K_{NH_4} + NH_4} \frac{DO}{K_{DO} + DO} \frac{ALK}{K_{ALK} + ALK} X_N \quad (2)$$

ここで、 $\mu_{\max}$ ：硝化細菌群の最大比増殖速度 ( $d^{-1}$ )、 $K_{NH_4}$ ：アンモニア性窒素 ( $NH_4-N$ ) の飽和定数 ( $mg-N/L$ )、 $K_{DO}$ ：溶存酸素 ( $DO$ ) の飽和定数 ( $mg/L$ )、 $K_{ALK}$ ：アルカリ度 ( $ALK$ ) の飽和定数 ( $mg/L$ )、 $b$ ：自己分解係数 ( $d^{-1}$ )、 $Y$ ：硝化細菌群の増殖収率 ( $mg-VSS/mg-N$ )、 $X_N$ ：硝化細菌群濃度 ( $mg-VSS/L$ ) である。本試験では、前述したように、アンモニア性窒素、溶存酸素、アルカリ度を十分に与えていることから、これらのMonod項は1と見なすことができる。したがって、それぞれ式(3)、(4)と表現できる。

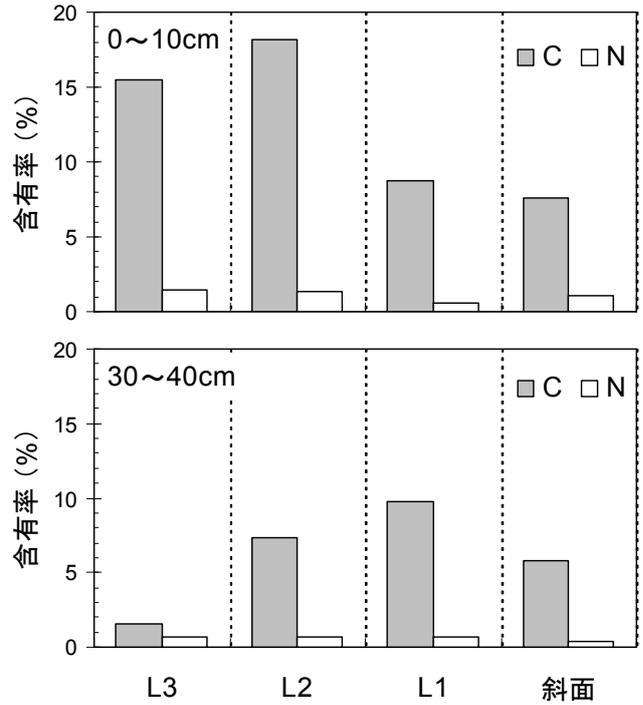


図-3 土壌中の炭素・窒素含有率

$$X_{N(t)} = X_{N(t=0)} \exp\{(\mu_{\max} - b)t\} \quad (3)$$

$$NO_{3(t)} = \frac{\mu_{\max} - b}{Y} X_N + NO_{3(t=0)} \quad (4)$$

ここで、 $X_{N(t=0)}$ 、 $NO_{3(t=0)}$ ：試験開始時の硝化細菌群濃度 ( $mg-VSS/L$ )、硝酸性窒素濃度 ( $mg-N/L$ )、 $t$ ：経過時間 ( $d$ ) である。 $\mu_{\max}$ 、 $b$ 、 $Y$ に文献値<sup>9)</sup>を与え、図-2に示したように、硝化活性試験におけるサンプリング時の硝酸性窒素濃度 $NO_{3(t)}$ の増加過程を再現できる試験開始時の硝化細菌群濃度 $X_{N(t=0)}$ を試行錯誤的に求めた。

硝化細菌群は、培養法あるいは分子生物学的な手法により定量することも可能であるが、ここでは簡単な回分試験と水質分析により定量可能な方法を用いた。

## 4. 結果および考察

### (1) 各地点の炭素・窒素含有率

各地点における0-10cm、30-40cmの土壌中の炭素・窒素含有率を図-3に示した。0-10cmの表層土壌の炭素含有率は、主流路に近いL2、L3の方が、斜面、L1よりも高かった。30-40cmでは、L1、L2、斜面では相対的に高く、L3は最も低かった。L3では、20-60cmにかけて土壌粒径が明らかに大きかった。したがって、細菌群が生息できる表面積が相対的に小さかったことが、このような結果になった理由のひとつとして考えられる。一方、窒素含有率は、各地点、深度ごとにも大きな違いは認められなかった。すなわち、硝化細菌群の基質となるアンモニア性窒素やその前駆物質である有機態窒素の存在量には、それほど違いはなかったものと解釈できる。

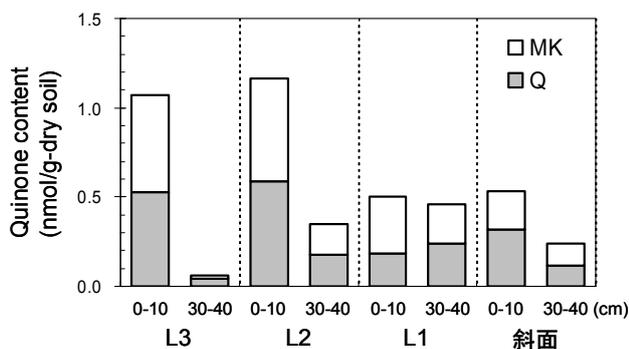


図-4 土壤キノン含有率

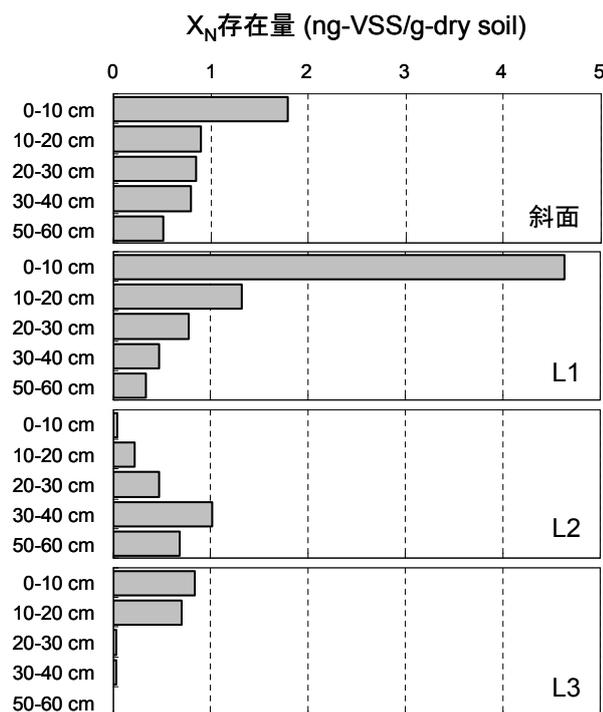


図-5 硝化細菌群の存在量

## (2) 土壤キノン含有率

各地点における0-10cm, 30-40cmの土壤キノン含有率を図-4に示した。前述したように、キノン量は細菌群量に対応することから、土壤キノン含有率が高いほど、土壤中の細菌群の存在量が多いことを意味する。表層土壤では、L2, L3の方が、斜面, L1よりも高かった。30-40cmでは、L1では表層土壤とそれほど違いは認められなかったが、斜面, L2では相対的に低く、L3では極端に低かった。このように、土壤キノン含有率は、土壤炭素含有率と対応していた。すなわち、炭素源が豊富なほど細菌群も多く存在していた。

## (3) 硝化細菌群の生息分布

動力学的に推定した硝化細菌群の存在量を図-5に示した。4地点の表層土壤を比較すると、L1が最も高く、斜面, L3, L2の順で小さくなるように推定された。鉛直方向に見てみると、斜面, L1, L3では、表層で最も高

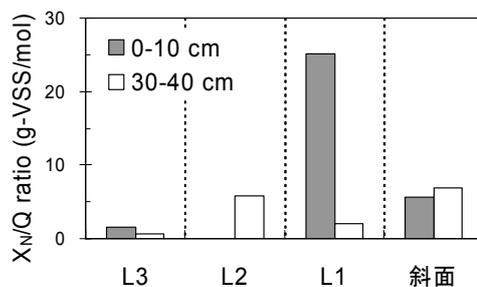


図-6 硝化細菌群量X<sub>N</sub>とユビキノロンQとの比(X<sub>N</sub>/Q比)

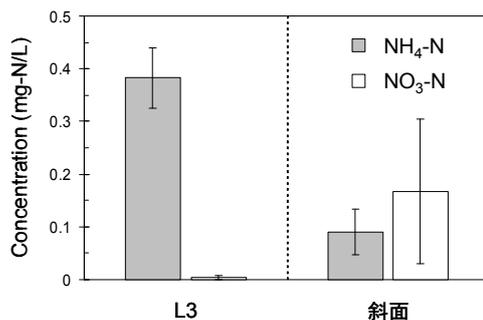


図-7 斜面とL3における土壤水中の窒素濃度

く、深くなるにつれて減少するように見積もられていた。硝化細菌群は、偏性好気性細菌であることから、このような推定結果になったのは妥当であると考えられる。しかしながら、L2では、表層が最も低く見積もられていた。このように、地点、深度によって、硝化細菌群の存在量には違いが見られた。

## (4) 硝化細菌群と従属栄養細菌群との酸素競争

硝化細菌群の生息に影響を及ぼす環境要因を探るために、まず、好気性細菌群に占める硝化細菌群の存在比を調べた。図-6に推定した硝化細菌群量(X<sub>N</sub>)と好気性細菌群が有するユビキノロン(Q)の存在量との比(X<sub>N</sub>/Q比)を示した。表層土壤では、L1が最も高く、斜面がそれに次いだ。が、土壤炭素含有率が高かったL3やL2では、低い値となった。30-40cmでは、ほぼ同じ土壤炭素含有率であった斜面やL2では、ほぼ同じ値となり、それらよりも土壤炭素含有率が低かったL1は、やや下回った。一方、明らかに土壤粒径が大きかったL3では、X<sub>N</sub>/Q比は極端に低かった。この比が低いということは、好気性の細菌群全体に対して、同じ好気性の細菌群である硝化細菌群の存在割合が低いことを意味することから、好気条件下であっても硝化細菌群は生息しにくかったものと解釈される。

図-7にL3と斜面の深さ10cmで採取した土壤水のアンモニア性窒素および硝酸性窒素濃度を示した。斜面では硝酸性窒素が検出されたが、L3ではほとんど検出されなかった。土壤に含まれる窒素は、有機態窒素やアンモニア性窒素が大部分を占めることが知られているが、土壤

水から硝酸性窒素が検出されたということは、硝化が起こっていた可能性が考えられる。一方、硝酸性窒素が検出されなかったL3では、硝化が起こらなかったか、あるいは起こったとしても、それよりも反応速度の大きい脱窒が卓越したことにより、硝酸性窒素が消失した可能性が考えられる。この場合、いずれにしても、溶存酸素が制限されていた可能性が十分に考えられる。

これを踏まえると、表層の土壌炭素含有率の高かったL2やL3において、 $X_N/Q$ 比が相対的に小さかったのは、次のように解釈することができる。これらの地点では炭素源が豊富に存在していたことから、従属栄養細菌群の増殖により溶存酸素が顕著に消費されたものと予想される。硝化細菌群の増殖速度は、従属栄養細菌群よりも小さいことから、硝化細菌群と従属栄養細菌群との間に、溶存酸素の競合が起こったため、硝化細菌群は存続しにくかったものと考えられる。

以上の結果から、硝化細菌群の生息が制限された理由として、従属栄養細菌群との間の溶存酸素の競合が関係することが考えられたが、そのような状況を生じた潜在的な要因のひとつに、土壌炭素含有率が挙げられよう。今回対象とした4地点におけるデータが限られていることから、なぜ同じ河畔域でもL2、L3とL1とでは、土壌炭素含有率が異なったかについては明らかではないが、地形・地質的な要因が密接に関係しているものと予想される。今後、これらのパラメータを同時に解析することで、河川源流域における水質浄化細菌群の生息分布を紐解くことができるものとする。

## 5. まとめ

河川源流域の斜面1地点と河川に至るまでの河畔土壌3地点（L1、L2、L3）、合計4地点を調査対象とした。表層土壌の炭素含有率が高かったL2、L3では、斜面、L1に比べてキノン含有率が高く、細菌群がより多く生息していたことが明らかとなった。一方、硝化細菌群の存在量を動力学的に推定したところ、土壌炭素含有率が高かったL2、L3では低く、逆に土壌炭素含有率が低かった斜面、L1では高く見積もられた。

そこで、斜面とL3における土壌水の窒素濃度を調べたところ、斜面では硝酸性窒素が検出されたのに対し、L3では検出されなかった。前者では、硝化が進んでいたものと解釈される。後者では、硝化が起こらなかったのか、あるいは硝化が起こっていたとしても脱窒により硝酸性窒素が消費された可能性が考えられる。いずれにしても、ここでは溶存酸素が制限されていたものと考えられる。一方、推定した硝化細菌群と好気性細菌群が有するユビキノンの存在量の比を調べたところ、土壌含有率が高かったL3では低く、逆にL1では高かった。したがって、炭素源が豊富に存在するほど、従属栄養細菌群の酸素消費量が多くなることから、従属栄養細菌群と硝化細菌群

との間に酸素の競合が起こり、その結果、増殖速度の小さい硝化細菌群は、生息しにくかったものと考えられた。

**謝辞：** 本学の修士課程の今井健太郎君には、土壌試料のキノン分析をご協力いただいた。本研究は、日本学術振興会平成17-18年度科学研究費補助金（基盤研究B）「微生物水文学的手法による水源汚染可能性評価のための基礎研究」（代表 坂本康）の支援を受けて行われた。以上をここに記し、深く謝意を表す。

## 参考文献

- 1) 河川の自浄作用研究班：河川の自浄作用，環境科学研究報告集B207-R12-5，1983.
- 2) 藤田昌史，芳賀弘和，松本嘉孝，坂本康，西田継，松谷順：山腹斜面流出解析へのキノンバイオマーカーの適用，水工学論文集，48，343-348，2004.
- 3) 藤田昌史，芳賀弘和，西田継，坂本康：山腹斜面流出過程におけるキノンバイオマーカーの動態解析，水工学論文集，Vol. 49，pp. 121-126，2005.
- 4) Haga, K., Matsumoto, Y., Matsutani, J., Fujita, M., Nishida, K. and Sakamoto, Y.: Flowpaths, rainfall properties and antecedent soil moistures controlling lags to peak discharge in a granitic unchanneled catchment, *Water Resource and Research*, 41, W12410, doi:10.1029/2005WR004236, 2005.
- 5) Hiraishi, A., Masamune, K. and Kitamura, H.: Characterization of the bacterial population structure in an anaerobic-aerobic activated sludge system on the basis of respiratory quinone profiles, *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 55, No. 4, pp. 897-901, 1989.
- 6) Furumai, H., Fujita, M. and Nakajima, F.: Quinone profile analysis of activated sludge in enhanced biological P removal SBR treating actual sewage, *Advances in Water and Wastewater Treatment Technology*, Matsuo, T., Hanaki, K., Satoh, H. eds., Elsevier, pp. 165-174, 2001.
- 7) Fujie, K., Hu, H.-Y., Tanaka, H., Urano, K., Saitou, K. and Katayama, A.: Analysis of respiratory quinones in soil for characterization of micro biota, *Soil Science and Plant Nutrition*, Vol. 44, No. 3, pp. 393-404, 1998.
- 8) Hasanudin, U., Fujita, M., Kunihiro, T., Fujie, K. and Suzuki, T.: The effect of clams (*Tapes philippinarum*) on changes in microbial community structure in tidal flat sediment mesocosm, based on quinone profiles, *Ecological Engineering*, Vol. 22, pp. 185-196, 2004.
- 9) IWA task group on river water quality modelling: River Water Quality Model No. 1, Scientific and Technical Report No. 12, IWA Publishing, London, 2001.
- 10) 味埜俊：活性汚泥モデル，環境新聞社，東京（2005）。

(2006. 9. 30受付)

