

感潮域における付着性藻類を中心とした 窒素系自浄作用に関する実験的研究

牧乃瀬 統¹・高橋 幸彦²・中村 玄正³

¹正会員 工修 日本大学大学院工学研究科・博士後期課程 (〒963-8642 福島県郡山市田村町徳定中原1)

²正会員 工博 哈爾濱工業大学市政環境工程学院 研究員 (〒150090 中国 黒龍江省哈爾濱市南崗区海河路 202 号)

財団法人 建設工学研究振興会 非常勤研究員 (〒980-0023 宮城県仙台市青葉区北目町 4-6)

³正会員 工博 日本大学教授 工学部土木工学科 (〒963-8642 福島県郡山市田村町徳定中原1)

本研究は、河川感潮域の窒素系自浄作用機構に関する知見を得るために、光照射のもとで単槽連続攪拌装置を用いて、藻類、硝化細菌共存系の基礎的なモデル実験をおこなった。感潮域の想定として塩分濃度を0%、25%、50%、75%、100%として設定し、希釈率の変化を滞留時間4、8、16、24、48hrとして、各態窒素濃度の変化を追うとともに藻類及び硝化細菌の活性を定量的に評価した。更にこれら微生物の共存下の関与度を明らかにした。その結果次のようなことが明らかとなった。1) 塩分濃度が低い系では希釈率が低いほど藻類による同化作用が優占され、希釈率が大きくなるに伴い硝化作用が優占する傾向が見られた。2) 塩分濃度が高い系においては希釈率が低いほど藻類による同化作用が優占され、希釈率が大きくなるに伴い硝化作用が優占するが、亜硝酸酸化細菌は塩分濃度に対して感受性が高く、亜硝酸性窒素が蓄積した。

Key Words: tidal area, self-purification, salt concentration, nitrification, algae, environment influence evaluation

1. はじめに

河川中流域¹⁾やその感潮部^{2), 3)}、干潟^{4), 5)}は、多種多様な生物が生息する重要な場であり、同時に有機物の酸化や窒素の酸化・還元、浮遊物質の沈殿等、自然の浄化作用が見られている。特に、河川感潮部では潮汐により淡水河川水と海水の混合形態は複雑であり、食物連鎖機構を含め浄化に関与する付着性微生物群の活性に与える影響も大きいものと考えられる。

また、沿岸域においても付着性微生物は、水質浄化のいろいろな局面に重要な役割を果たしている。近年、干潟が極めて高い水質浄化能力を有することが重要視⁶⁾されており、干潟の浄化能力を適正に評価することは、沿岸域の自然再生を検討する際の環境影響評価や実河川感潮域の水質改善方法の提案を図ることが可能となる。一次生産者である藻類は、一般に二次的汚濁負荷の発生としてとらえられている。しかし、藻類は増殖過程において水中から栄養塩を摂取することから、本来大きな水質浄化能を有している。そのために、河川感潮部及び沿岸域における微生物群の浄化能力を強化するとともに、藻類と硝化・脱窒細菌の共存下の関与度を実験的に明らかにする必要がある。

筆者ら⁷⁾は、河川上流域における下水処理場処理水が放流先の河川環境にどの程度影響を及ぼすか把握するために藻類の潜在能力試験 (AGP試験) を行った結果、下

水処理場処理水の AGP 値は 250~400mg/l 程度であり、COD_{mn} に換算すると 120~200mg/l (藍藻類重量 1mg=0.48mgCOD を引用⁸⁾) であることがわかった。

本研究は、感潮域における窒素系自浄作用の機構解明を目的とする実験研究の一つである。塩分濃度を段階的に設定するとともに希釈率を変化させて窒素系水質浄化に関与する硝化細菌及び藻類の活性を定量的に評価し、河川感潮部及び沿岸域の浄化特性に関する基礎的情報を得ることを目的とした。この研究結果は、沿岸域の自然再生を検討する際の水域環境影響評価及び水環境保全に極めて重要な知見を与えるものと考えられる。

なお、本研究の一部はすでに発表している⁹⁾が本編はこれにその後の成果を加えて取りまとめたものである。

2. 窒素収支モデル

水域の水質保全を図り水域の許容量を評価するためには自然の浄化能力の機構を解明する必要がある。しかしながら、実水域においては流量、水質、負荷量などは時々刻々変化し、これに影響する日照や水温さらに季節変動等影響因子は極めて多く複雑であり、流量収支や物質収支を把握し、その自浄作用機構を解明することは極めて難しい。自浄作用に関する研究は、多くが炭素系物質を対象としたものである。例えば、炭素収支モデルから、

大垣¹⁰⁾は、グルコースを炭素源として従属栄養細菌の付着微生物の増殖特性を動力的手法により明らかにしている。一方窒素系物質に関しての自浄作用機構に関する研究は少なく、それらは硝化・脱窒を対象としたものである。松本¹¹⁾は下水処理場における生物学的脱窒法の硝化及び脱窒特性やそれぞれの反応速度論的な考え方をもとにして、河川の窒素系自浄作用機構を解明しようとした。川崎¹²⁾は、暗条件における硝化細菌と従属栄養細菌の相互作用について検討している。さらに、暗条件下での付着生物膜の硝化活性に与える海水濃度の影響を検討しており、室内実験レベルであるが暗条件下における硝化を対象とした窒素系自浄作用について貴重な結果を報告している。しかしながら、実河川や海域の浄化能力を評価するためには、光合成反応も含めた形で浄化能力の機構を解明する必要がある。

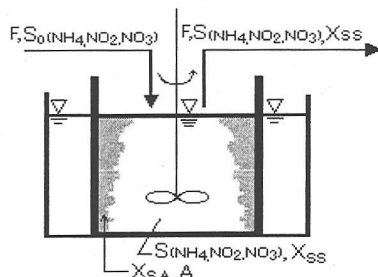


図-1 物質収支図

$$Eff. NH_4^+ - N \text{率}(\%) = \frac{F \cdot S_{NH_4}}{F S_{0(NH_4+NO_2+NO_3)}} \times 100 \quad (1)$$

$$Eff. NO_2^- - N \text{率}(\%) = \frac{F \cdot (S_{NO_2} - S_{0NO_2})}{F S_{0(NH_4+NO_2+NO_3)}} \times 100 \quad (2)$$

$$Eff. NO_3^- - N \text{率}(\%) = \frac{F \cdot (S_{NO_3} - S_{0NO_3})}{F S_{0(NH_4+NO_2+NO_3)}} \times 100 \quad (3)$$

$$Assimilated N \text{率}(\%) = 100 - Eff. (NH_4^+ - N + NO_2^- - N + NO_3^- - N) \quad (4)$$

ここで、 S_0, S は流入、流出の窒素濃度 (mg-N/l)、 F は流量 (l/day) である。

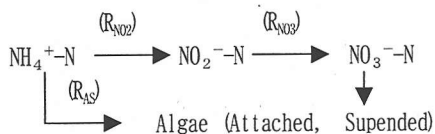
(1) 窒素収支

藻類と硝化細菌を共存させ、完全混合連続攪拌装置 (CSTR) を用いて連続培養を行ったときの投入されたアンモニア性窒素の形態変化は次のように示される。

投入された基質である $NH_4^+ - N$ は、① $NH_4^+ - N$ のまま流出するか、② $NO_2^- - N$ か $NO_3^- - N$ へと硝化されて流出するか、③ 藻類による窒素の摂取の3通りとなる。ここで、脱窒反応と細菌による窒素の摂取については、以下の理由により無視した。脱窒反応については、生物膜の成長に伴う無酸素域の発生も考えられるが、流入水には有機物の投入を行っていないため、脱窒反応は微小であると推定される。細菌による窒素の摂取は、本実験で得られた生物重量から窒素含有量を換算すると (藻類組成 $C_{106}H_{263}O_{110}N_{16}P^{13}$ 、細菌組成 $C_{60}H_{97}O_{23}N_{12}P^{14}$)、細菌窒素含有量/藻類窒素含有量 = $1/10^4 \sim 10^7$ と極微量である。

流量が一定であるので、定常期におけるこれらの窒素形態を割合で表した窒素収支率は、式(1)、(2)、(3)、(4)のようになる。

藻類が同化に利用する無機性窒素の形態は、 $NH_4^+ - N$ を最もよく同化し、自然界における最終形態の $NO_3^- - N$ を同化に利用するのは前者が低濃度になった場合といわれている¹³⁾。本実験においては、 $NH_4^+ - N$ を基質として連続流入していることより、式(2)、(3)に示される通り $Eff. NO_2^- - N$ 率、 $Eff. NO_3^- - N$ 率は得られた濃度にて評価した。また、式(4)においては、藻類による窒素固定を無視し、図-1に示されるモデルを仮定した。



(2) 基質消費速度と硝化速度・同化速度

定常期における、単槽連続攪拌装置を用いたときのアンモニア性窒素の物質収支は、以下に与えられる。

$$F(S_{0NH_4} - S_{NH_4}) = V \left(-\frac{dS}{dt} \right)_C = \frac{X_{SA} + X_{SS}}{X_{SA}} \cdot A \cdot (-R_S) \quad (5)$$

ここで、 X_{SA}, X_{SS} は、反応槽当りの付着、浮遊生物量 (mg) である。

付着性生物(藻類と硝化細菌)による、基質消費速度 (アンモニア性窒素消費速度) $-R_S$ は次式となる。

$$-R_S = \frac{F}{A} (S_{0NH_4} - S_{NH_4}) \frac{X_{SA}}{X_{SA} + X_{SS}} \quad (6)$$

$-R_S$ は、 $NH_4^+ - N$ 消費速度 (mg-N/m² day)、添字 C は消費、A は有効付着面積 (m²) である。

同様に、亜硝酸性窒素生成速度 R_{NO_2} 、硝酸性窒素生成速度 R_{NO_3} 、窒素同化速度 R_{AS} は、次式となる。

$$R_{NO_2} = \frac{F}{A} [S_{(NO_2+NO_3)} - S_{0(NO_2+NO_3)}] \quad (7)$$

$$R_{NO_3} = \frac{F}{A} (S_{NO_3} - S_{0NO_3}) \quad (8)$$

$$R_{AS} = (-R_S) - (R_{NO_2}) \quad (9)$$

(3) 比窒素摂取速度

藻類の窒素化合物の摂取速度 V は、次式となる。

$$V = \frac{F \cdot (S_{0(NH_4+NO_2+NO_3)} - S_{(NH_4+NO_2+NO_3)})}{X_{SA} + X_{SS}} \quad (10)$$

3. 実験方法

(1) 実験装置

本実験は、感潮域を想定した塩分濃度 0%系、25%系、50%系、75%系、100%系（人工海水）の5系列の室内モデル実験であり、塩分濃度による付着性藻類と硝化細菌の挙動を追求している。実験装置の概略を図-2、実験装置の諸元を表-1に示す。反応槽は1辺10.5cm、高さ15cmの正八角形であり、各系5槽づつ反応槽を設けている。壁面には、生物が付着し易いように縦15cm、横1.5cmの粗さのついた接触板を1槽当りに20枚設置している。反応槽の有効容量は5L、槽内の有効付着面積は1,322cm²である。実験条件は、藻類の律速因子にならないように水温、照度は以下のように設定した。反応槽の水温を一定に保つために、恒温槽を設け水温を25℃に制御した。照度は水面で10,000luxとなるように上方より白色蛍光灯を用いた。本来、照射時間は日照時間を考慮して明暗12時間に設定するが、藻類のポテンシャル（潜在能力）を実験的に明らかにするために24時間連続照射とした。反応槽は攪拌機を設けており、完全混合単槽連続攪拌槽を用いた。この時、Cl⁻をトレーサーとし硝酸銀法による塩素イオン濃度測定による δ 応答法によって検討の結果、完全混合状態であることを確認した。攪拌機の回転数は100rpmである。

各反応槽への基質の流入は、マイクロチューブポンプを用いて、希釈率を5段階に設定し、塩分濃度0%系、25%系、50%系、75%系、100%系にそれぞれ連続投入した。各反応槽の希釈率および滞留時間を表-2に示す。

表-1 装置諸元

有効容量	5.0 l
付着面積	1,322 cm ²
水温	25℃
照度	10,000 lux
攪拌数	100 rpm

表-2 希釈率および滞留時間

No.	希釈率 (day ⁻¹)	滞留時間 (hr)
A	6	4
B	3	8
C	1.5	16
D	1	24
E	0.5	48

希釈率=1/滞留時間

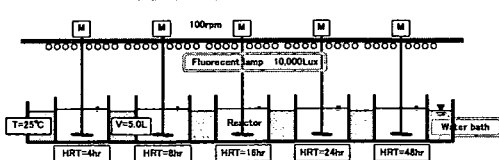


図-2 実験装置の概略図

(2) 基質及び微量元素の設定

各槽の基質投入量を表-3示す。基質は塩化アンモニウムを窒素源として用いた。藻類に必要な窒素源はアンモニア性窒素または硝酸性窒素であるが、硝化細菌による窒素の代謝等を含めた共存系でのそれぞれの関係を明らかにするためにアンモニア性窒素を用いた。リンについては、藻類の増殖の制限基質とならないように投入した。

微量元素を表-4、表-5に人工海水（塩分濃度100%）を示す。塩分濃度0%系（FW 0%）の流入水は、微量元素100%のみとし、塩分濃度100%系（SW 100%）の流入水は、人工海水100%のみとし基質を投入した。一方、塩分濃度25%系（FW 25%）の流入水は、微量元素75%と人工海水25%を混ぜ合わせ、基質を投入した。同様に、塩分濃度75%系（SW 75%）では、微量元素25%と人工海水75%を、塩分濃度50%系（FW 50%、SW 50%）では、微量元素50%と人工海水50%を、混ぜ合わせ、基質を投入した。なお、本実験は藻類と細菌の共存下での窒素の消長を把握することを目的であり、藻類の炭酸同化作用によるpHの上昇や硝化作用の進行によるpHの低下が起こり得るが、pHの調整は行っていない。

また、流入水は水道を用いて作成しており、珪藻類に必要なSiO₂は充分含まれている。水道水中に含まれるSiO₂濃度は10~30mg/l程度であり、日本の湖沼および河川に含まれるSiO₂濃度は湖沼で1~42mg/l、河川で6~55mg/l程度である¹⁵⁾。

なお、これらの設定条件は川崎¹²⁾の実験条件を参考として決定した。

(3) 植種した試料

付着生物膜の硝化活性に与える海水濃度の影響を検討する際、川崎¹²⁾は下水処理場の返送汚泥中の硝化細菌を植種試料として一定の海水濃度で連続培養している。本実験では海水濃度の影響を検討することを目的としたため、淡水系（FW）と海水系（SW）に区分して連続培養を

表-3 基質

NH ₄ Cl	10mg-N/l
KH ₂ PO ₄	0.6mg-P/l
Na ₂ HPO ₄	1.5mg-P/l
水道水	

表-4 微量元素

MgSO ₄ ·7H ₂ O	26.7mg/l
CaCl ₂ ·2H ₂ O	26.7mg/l
FeSO ₄ ·7H ₂ O	5.0mg/l
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	8.8mg/l
MnCl ₂ ·4H ₂ O	1.4mg/l
CuSO ₄ ·5H ₂ O	1.6mg/l
水道水	

表-5 人工海水

NaCl	23.48g/l
MgCl ₂ ·6H ₂ O	10.64g/l
Na ₂ SO ₄	3.92g/l
CaCl ₂ ·2H ₂ O	1.46g/l
KCl	0.66g/l
NaHCO ₃	0.19g/l
KBr	0.10g/l
H ₃ BO ₃	0.03g/l
SrCl ₂ ·6H ₂ O	0.04g/l
水道水	

表-6 各系の培養液

No.	微量元素	人工海水
FW 0-I	100%	0%
FW 25	75%	25%
FW 50	50%	50%
SW 50	50%	50%
SW 75	25%	75%
SW 100	0%	100%

行った。植種試料は、淡水系では阿武隈川中流域（福島県郡山市）の河床礫生物膜、海水域では蒲生干潟（宮城県仙台市）のコンクリート護岸に付着していた生物膜を用い、現場でワイヤーブラシを用いて剥ぎ取ったものをそれぞれ等量づつ混ぜ合わせ乾燥重量で12gとなるように調整し、各反応槽の壁面に付着させて植種とした。その後、12日間のバッチ培養を行いそれぞれの海水濃度に馴致した後、培養液の連続流入と連続攪拌を開始した。さらに、塩分濃度25%、75%系については、塩分濃度0%、100%を5日間毎に5%づつ上げるまたは下げるにより塩分濃度25%、75%に至るまで25日間にわたって段階的に馴致を行い、連続実験を開始した。塩分濃度50%系については、塩分濃度25%および75%にて培養実験を行ってきたものを同様に5%づつ調整を行い、FW 50%およびSW 50%とした。

(4) 分析方法

分析¹⁶⁾は、主に孔径1μmのろ紙によりろ過したろ液を用いて行った。ただし、COD_{OH}、T-Nに関しては、ろ過しないものを検水にした。SS、Org-N、クロフィルは反応槽から直に採取して検水とした。なお、COD_{OH}、SS、Org-N、クロフィル等の生物量に関わる分析は、付着性についても行った。分析項目は、pHはガラス電極法、COD_{OH}は7%過マンガン酸カリウム法、NH₄⁺-Nはインドフェノール青吸光度法、NO₂⁻-NはN-(1-ナフチル)エリブアミン吸光度法、NO₃⁻-Nはブルシ法、T-N、Org-Nは紫外線吸光度法（FW 0%およびSW 100%においてはケルダール窒素法）、PO₄³⁻-Pはメリブデン青〔塩化すず(Ⅱ)〕吸光度法、SSはガラス繊維ろ紙法（Whatman GF/B）、クロフィルはアセトン抽出-吸光度法（Whatman GF/C）、塩素イオンは硝酸銀法で行った。また、定常期には硝化細菌数と脱窒細菌数の計数を最確値法（MPN法）^{17) 18)}で調べた。

4. 結果及び考察

松本¹¹⁾は、河川における有機物代謝に関与する微生物は主に付着性によるものが多く、有機物の付着生物群への変換率は希釈率の増加（滞留時間の短縮）に伴い減少することを確認している。本実験では各系において全生物量に対する付着生物量の割合は90%程度であり、窒素の形態変化は付着生物膜の藻類と硝化細菌が支配的であると考えられる。以下に、無機性窒素の経日変化と定常期における塩分濃度と希釈率における窒素収支率、硝化速度と同化速度、生物量との関係を検討した。

(1) 無機性窒素の経日変化

単槽連続攪拌装置（CSTR）を用いて、連続的にNH₄⁺-Nを流入させた時の無機性窒素の変化を経日的に追ってみ

た。代表的な無機性窒素の経日変化として、図-3に滞留時間16時間における塩分濃度25%と75%の経日変化を示す。一般的な藻類の比増殖速度 μ は0.3~0.7day⁻¹¹⁹⁾（*Chlorella sp.*を除く）であり、硝化細菌の比増殖速度 μ はアンモニア酸化細菌で0.6day⁻¹²⁰⁾、亜硝酸酸化細菌で1.6day⁻¹²⁰⁾である。すなわち、本実験では希釈率Dを0.5~6.0day⁻¹（滞留時間HRT=4~48hr）に設定しており、槽内に介在する藻類と硝化細菌のほとんどが付着性生物膜に存在するものである。なお、図-3は希釈率D=1.5day⁻¹の連続実験データである。

投入されたNH₄⁺-Nは、塩分濃度の低い25%系においては0~60日にかけて低下している。一方、NO₂⁻-N、NO₃⁻-Nの生成はない。また、塩分濃度の高い75%系においても0~30日にかけて同様な傾向を示している。これは、槽内の壁面に植種した藻類がNH₄⁺-Nを摂取し、反応槽内で徐々に付着生物膜として成長していったためである。その後、付着性生物膜中で硝化細菌が増殖し硝化作用が徐々に進行したものと考えられる。

一般河川のように流量が変動しやすい場では、付着性生物膜は増殖と剥離を繰り返して成長する²⁾が、本実験では連続実験期間中生物膜は安定的に成長し続け、その後SSは一定値を示した。実験条件は、滞留時間、回転数（攪拌）を一定としており、各槽の生物膜は滞留時間に依存されて増殖される。すなわち、付着生物膜の成長は式(5)に示される通り、流量が多い（HRTが短い）程、生物の増殖速度は大きくなる。また、定常状態においては、成長した生物膜は攪拌装置により増殖と剥離が平衡状態に保たれ、一定の生物膜厚さが維持されたと推察された。

塩分濃度の低い25%系においては徐々に硝化作用は進行され、60~90日付近においてNO₂⁻-Nが生成し、90日以降はNO₃⁻-Nまで進行している。流入したNH₄⁺-N

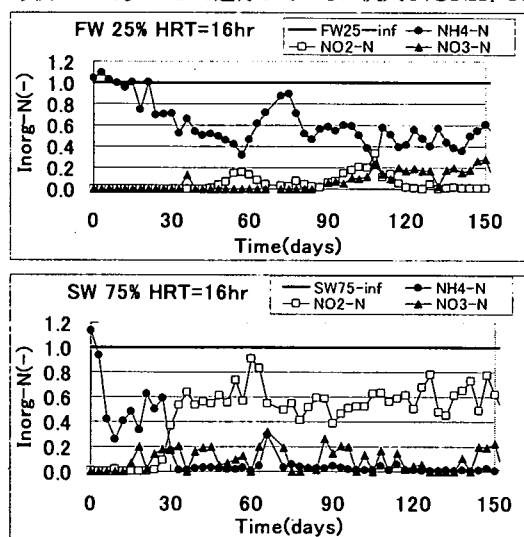


図-3 無機性窒素の経日変化

は一定であり、そのまま流出した $\text{NH}_4^+\text{-N}$ と生成された $\text{NO}_2^-\text{-N}$ 、 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ の窒素収支において不足分は藻類による窒素の摂取と判断される。一方、塩分濃度の高い75%系においては、経過日数30日以降に硝化作用は進行されるが、完全硝化までは起こらず $\text{NO}_2^-\text{-N}$ の蓄積が生じた。

実感潮域では、周期的に河川水と海水が混合されて塩分濃度が変化するが、塩分濃度の変化に対応できる硝化細菌が介在し硝化作用における $\text{NO}_2^-\text{-N}$ の蓄積はほとんど生じないものと考えられる。二波²⁾は塩分濃度の影響による亜硝酸酸化速度の相違はあるが $\text{NO}_2^-\text{-N}$ の蓄積はないと報告している。

本実験においては、淡水性・海水性の藻類および硝化細菌を混合させたものを植種しており、窒素の消長を塩分濃度の影響により連続実験にて追求したが、塩分濃度の低いときに硝化作用は $\text{NO}_3^-\text{-N}$ まで完全硝化するが塩分濃度が高いときは $\text{NO}_2^-\text{-N}$ の蓄積が生じた。すなわち、川崎¹²⁾の行った実験での塩分濃度の影響による $\text{NO}_2^-\text{-N}$ の蓄積が確認された。また、硝化作用に対する光阻害の影響については、硝化活性への影響がどの程度であるか本実験では判断できないが硝化の進行が確認されたため(図-3)、光阻害の影響は少ないものと判断された²¹⁾。

(2) 窒素収支率

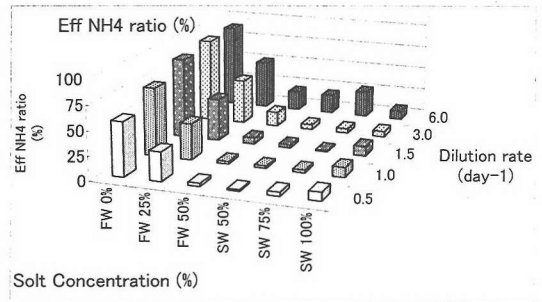
基質である $\text{NH}_4^+\text{-N}$ をベースに、① $\text{NH}_4^+\text{-N}$ のまま流出する割合を $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 流出率、② $\text{NO}_2^-\text{-N}$ となって流出する割合を $\text{NO}_2^-\text{-N}$ 流出率、③ $\text{NO}_3^-\text{-N}$ となって流出する割合を $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 流出率、④ 藻類に変化した割合を藻類による同化率として流出する窒素形態を窒素収支率として定常期の実験結果を考察する。本実験は前述した通り、概ね藻類と硝化細菌の比増殖速度 $\mu <$ 希釈率 D であり、また、実験で得られた生物量の概ね90%が附着性であった。

図-4(a)は $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 流出率、図-4(b)は $\text{NO}_2^-\text{-N}$ 流出率、図-4(c)は $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 流出率、図-4(d)は藻類による同化率を示している。図-4(a)の $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 流出率に見られるように、塩分濃度が低いFW 0%系、FW 25%系は投入基質の $\text{NH}_4^+\text{-N}$ が生物の増殖や代謝に関与しない状況で流出していることが顕著に見られている。

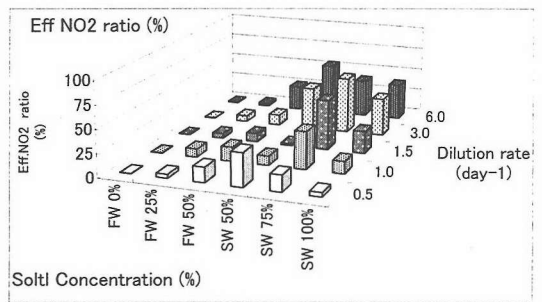
一方、塩分濃度が高いFW 50%系とSW 50%~100%系では $\text{NH}_4^+\text{-N}$ の流出はほとんど認められず(図-4(b)、図-4(c)、図-4(d)から判断すると生物の増殖や代謝、すなわち硝化や同化作用により消費されたものと考えられた。

図-4(b)は $\text{NO}_2^-\text{-N}$ 流出率、図-4(c)は $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 流出率を示している。これらの図では、 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ がアンモニア酸化細菌により $\text{NO}_2^-\text{-N}$ に酸化され、さらに亜硝酸酸化細菌により $\text{NO}_3^-\text{-N}$ に酸化された状況を示している。図-4(c)のSW 75%系、SW 100%系における $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 流出が低く、図-4(b)の流出 $\text{NO}_2^-\text{-N}$ が高いことから判断して流入 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ がアンモニア酸化細菌により $\text{NO}_2^-\text{-N}$ までは進むものの、亜硝酸酸化細菌の活性が塩分濃度により阻害されるため $\text{NO}_2^-\text{-N}$

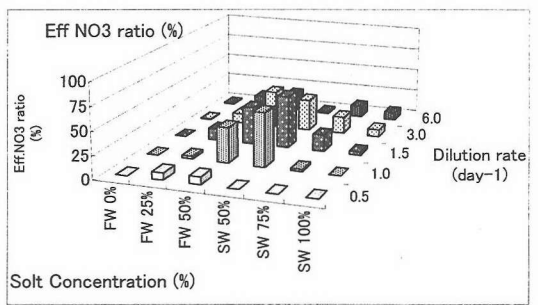
が蓄積されたものと考えられる。これに対して塩分濃度が低いFW 50%系とSW 50%系では硝化が進行して $\text{NO}_3^-\text{-N}$ として流出している。また、塩分濃度の最も低いFW 0、25%系では若干ではあるが $\text{NO}_3^-\text{-N}$ まで進行しており、硝化細菌に比べ藻類の窒素の摂取が大きい結果が得られた。



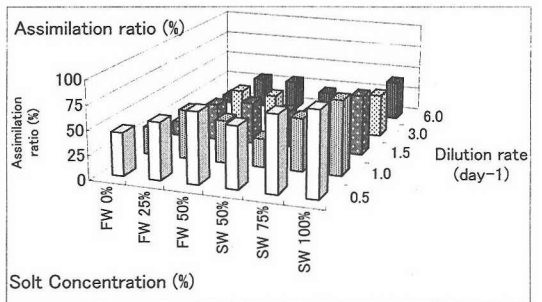
(a) $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 流出率



(b) $\text{NO}_2^-\text{-N}$ 流出率



(c) $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 流出率



(d) 窒素同化率

図-4 窒素収支率

これらの結果から判断して感潮域での硝化細菌による流入 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ の窒素変換は塩分濃度により強く影響を受けることが考えられた。すなわち、潮汐の影響により硝化活性が大きく影響されることが推測される。図-4 (d) は藻類による同化率を示しているが、希釈率が低く、塩分濃度の低いところで 50% 程度の同化が見られ、塩分濃度が大きくなるに伴い同化の割合が高くなる傾向が見られた。また、希釈率が大きくなるに伴い同化の割合が低くなる傾向が見られ、硝化細菌と藻類との共生効果が考えられた。

以上のようなことから、淡水域および低塩分濃度を想定した感潮域 (塩分濃度 FW 0~25% 系) においては、消費された $\text{NH}_4^+\text{-N}$ の殆どは、硝化作用に比べ藻類による窒素の摂取が優占される。

一方、海水域および高塩分濃度を想定した感潮域 (塩分濃度 FW 50% 系, SW 50~100% 系) においては、希釈率が高いと硝化が優占され、希釈率が低い場合、藻類による窒素の摂取が優占される。しかし、硝化作用に関しては塩分濃度の影響が極めて大きく、自然界²³⁾とは異なって $\text{NO}_3^-\text{-N}$ まで硝化作用は進行せず、 $\text{NO}_2^-\text{-N}$ が蓄積された。

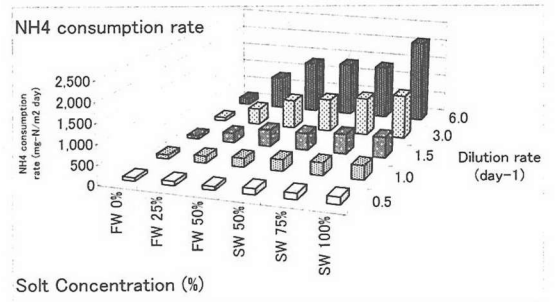
(3) $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 消費速度・硝化速度・同化速度

定常期において、単槽連続攪拌装置でのそれぞれの速度は前述の式(5)をもとに、式(6)、式(7)、式(8)、式(9)のように1日の面積あたりの変化量で示される。ここでは、前項で述べた窒素収支率とは異なり、希釈率と速度の関係について評価する。各速度は、流量に依存されるので、理論上希釈率の大きい槽程大きくなる。なお、実験装置内には藻類や硝化・脱窒細菌が混在した条件下で連続実験を行っており、ここで得られる $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 消費速度や硝化速度・同化速度は、見かけ上の速度と判断する必要がある。

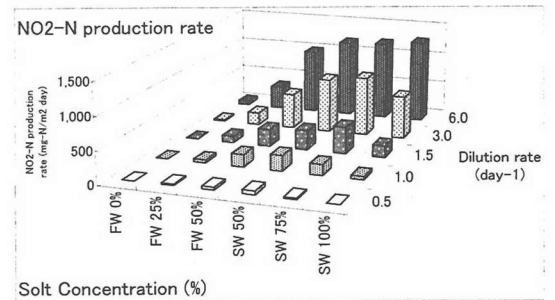
これらの実験結果を、塩分濃度変化及び希釈率変化を基軸として、図-5 (a) には $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 消費速度、図-5 (b) は $\text{NO}_2^-\text{-N}$ 生成速度、図-5 (c) は $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 生成速度、図-5 (d) は藻類による窒素同化速度を示す。

図-5 (a) の $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 消費速度をみると、塩分濃度が大きくなるに伴い、 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 消費速度は大きくなり、また希釈率が大きくなるに伴い $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 消費速度は大きくなる傾向が見られている。図-5 (b) は $\text{NO}_2^-\text{-N}$ 生成速度を示しているが、特に塩分濃度が高い FW 50%, SW 50%~SW 100% 系の希釈率 3.0, 6.0 day^{-1} では大きく、この時の生成速度は 1,200 $\text{mg-N/m}^2\cdot\text{day}$ 程度と非常に大きな値が得られた。なお、川崎¹²⁾は純粋硝化系の実験で希釈率 6.0 day^{-1} の同様な塩分濃度の影響下で $\text{NO}_2^-\text{-N}$ 生成速度 1,000 $\text{mg-N/m}^2\cdot\text{day}$ 程度と報告している。これに対して、図-5 (c) に示している $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 生成速度は、塩分濃度、希釈率いずれの系においても $\text{NO}_2^-\text{-N}$ 生成速度に比して非常に小さい。このことから、実際の感潮域では $\text{NO}_2^-\text{-N}$ 生成速度が $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 生

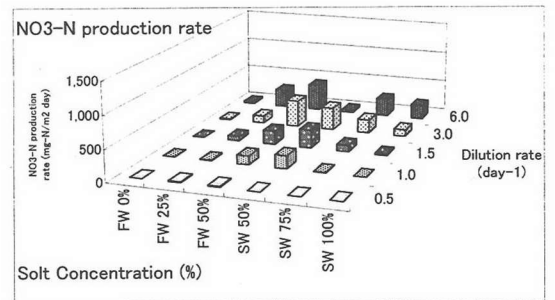
成速度より優占することが推測された。塩分濃度が 50% 系の FW 50% 系, SW 50% 系においてのみ、硝化が進行して $\text{NO}_3^-\text{-N}$ が生成されている。この時の生成速度は 420 $\text{mg-N/m}^2\cdot\text{day}$ 程度の値が得られた。なお、川崎¹²⁾は $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 生成速度 52 $\text{mg-N/m}^2\cdot\text{day}$ 程度と報告しており、本実験にお



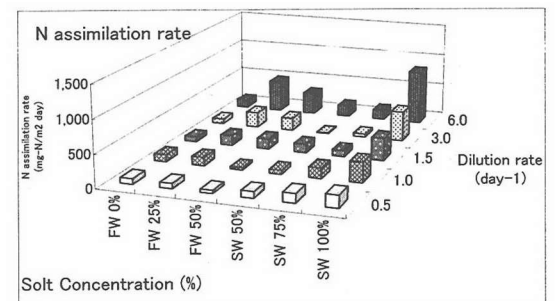
(a) $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 消費速度



(b) $\text{NO}_2^-\text{-N}$ 生成速度



(c) $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 生成速度



(d) 窒素同化速度

図-5 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 消費速度および硝化速度・同化速度

ける生成速度は高い傾向が得られた。また、本実験は主に付着性藻類の同化作用のポテンシャル（潜在能力）を明らかにすることを目的としているので、24時間連続照射して反応槽内の溶存酸素を高いレベルに維持したが、付着性藻類を主体とする生物膜内部では溶存酸素が低下して部分的に無酸素状態になっていることが推定され、**図-5(c)**に示されるように NO_3^- -Nの生成が小さくなったことも考えられる。本実験では検討していないが投入基質にグルコースを併用するとグルコース濃度が一定以上になると硝化が抑制されることが報告¹²⁾されている。自然界においては、硝化作用は独立栄養性の硝化細菌が支配的であると考えられるが、硝化能力は低いが従属栄養性の硝化細菌も存在していることが予測されるため、グルコース濃度を基質とした場合における独立栄養と従属栄養細菌の優占種と本実験で確認できなかったそれぞれの硝化活性を検討する必要がある。

図-5(d)は藻類による窒素同化速度を示している。全体的に窒素同化速度は顕著な変動は見られないが、若干塩分濃度と希釈率が大きくなるに伴い同化速度は大きくなる傾向が見られる。ただし、塩分濃度の高いSW 100%では希釈率6.0day⁻¹の時、著しく高い値が得られている。無機性窒素の付着性藻類への転換は、**図-4(d)**では希釈率が小さい（HRTの長い）程同化率は高いが、**図-5(d)**では希釈率の小さい（HRTの長い）程同化速度は低いと顕著な差異はない。すなわち、希釈率が大きい程流入した窒素の多くが藻類の同化に使われていないことがわかる。

したがって、淡水域および低塩分濃度を想定した感潮域（塩分濃度FW 0%~FW 50%）においては、塩分濃度が高く、希釈率が大きくなるに伴い NH_4^+ -N消費速度および硝化速度・同化速度は大きくなる傾向にあった。

一方、海水域および高塩分濃度を想定した感潮域（塩分濃度SW 50%~SW 100%）においても、塩分濃度の低い条件と同様に塩分濃度が大きいほど NH_4^+ -N消費速度および硝化速度・同化速度は大きくなる傾向にあった。さらに希釈率が大きくなるに伴い NH_4^+ -N消費速度および硝化速度・同化速度は増加する傾向を示したが、 NO_2^- -N生成速度が顕著に高い値であった。川崎¹²⁾の行った暗条件で水温20℃の実験結果では、塩分濃度の上昇に伴い NO_2^- -N生成速度は増大し、 NO_3^- -N生成速度は塩分濃度約10%程度を最大値として下降すると報告されている。本実験においても、塩分濃度が大きくなるに伴い NO_2^- -Nの蓄積は同様な傾向が得られ、亜硝酸酸化細菌はアンモニア酸化細菌より塩分濃度に対して感受性が高いことが再確認できた。

(4) 生物相について

植種した藻類および硝化細菌は、淡水性と海水性の生物を混合させ各反応槽へ植種しており、実験開始当初の各反応槽に介在する生物群の条件は同一である。また、

生物膜の剥離は実験期間中少なく、SSは一定値を示し安定していた。

a) 優占藻類

顕微鏡観察とコロニー a, b, c の分析により、定常期における各系槽内の優占している藻類を同定した結果、塩分濃度の低いFW 25%系では、緑藻類の Ulothrix sp. と Chlorella sp.、藍藻類の Oscillatoria sp. と Phormidium sp.、珪藻類の Amphora sp. 等が介在していた。この時の優占種については淡水域や感潮域に生息可能な藻類であり、希釈率の高い槽では、Ulothrix sp. と Chlorella sp. が優占し、希釈率の低い槽では、Oscillatoria sp. と Phormidium sp. が優占していた。また、希釈率に関係なく Amphora sp. が優占していた。

塩分濃度の高いSW 75%系では、緑藻類の Ulothrix sp.、Chlorella sp. と Phormidium sp.、藍藻類の Oscillatoria sp.、Phormidium sp. と Anabaena sp.、珪藻類の Amphora sp.、Cymbella sp. と Fragilaria sp. 等が介在していた。優占種については、全槽 Chlorella sp.、Oscillatoria sp.、Phormidium sp.、Amphora sp.、Cymbella sp. が優占していた。

顕微鏡観察は、実験期間中、常時、行っていなかったが槽内の藻類は糸状性の藻類が粗さのついた反応槽壁面または底部に付着し、ある程度の生物膜厚さを確保した後に単細胞性の藻類が糸状性藻類に絡まって増殖していたと思われる。その結果、定常期における優占種は、

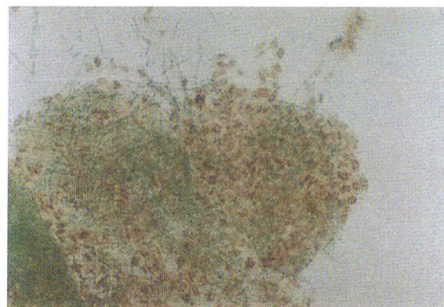


写真-1 Hormidium sp. (糸状)と Chlorella sp. (単細胞)

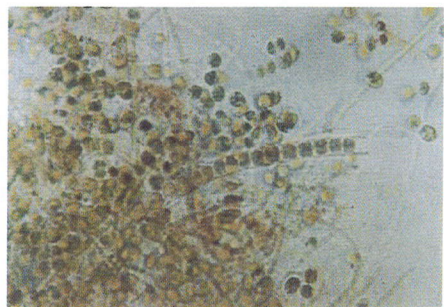


写真-2 Oscillatoria sp. (糸状)と Amphora sp. (単細胞)

実験の経過と共に馴致され、比較的同一種の藻類が混在したと思われる。

以上の結果から、藻類の優占種は低塩分濃度で希釈率が大きい槽においては淡水河川に生息するような緑藻類が介在し、それ以外の槽では湖沼や感潮域に生息するような藍藻類が介在していた。

b) 藻類量

図-6 (a) に浮遊性藻類量を、図-6 (b) に付着性藻類量の乾燥重量を示す。塩分濃度の低い培養液の履歴を持つ藻類 (FW 0%, FW 25%, FW 50%) において浮遊性藻類量は、生物量に余り変動は見られなかった。ただし、塩分濃度を50%の条件下における生物量は、希釈率の低い0.5~1.0 day⁻¹の槽において、顕著に増加した。付着性藻類量は希釈率の相違に伴う変動は浮遊性藻類量に比べ極めて小さく、塩分濃度の相違に伴う生物量の変化は小さいと判断された。

一方、塩分濃度の高い培養液の履歴を持つ藻類 (SW 50%, SW 75%, SW 100%) においては、浮遊性藻類量と付着性藻類量は共に塩分濃度を50~75%の条件下では余り変動は見られなかった。ただし、塩分濃度が100%の条件下における生物量は希釈率の低い0.5~1.5 day⁻¹の時、顕著に増加していた。(3) NH₄⁺-N 消費速度・硝化速度・同化速度にて述べた通り、無機性窒素の付着性藻類への転換は、希釈率の大きい (HRTの短い) 程低く、流入した窒素の多

くが藻類の同化に使われていない結果の確認ができよう。全ての槽においても、塩分濃度や希釈率に関わらず浮遊性藻類量と付着性藻類量の割合は、付着性藻類が90%程度存在し、槽内の生物群は付着性が支配的なことを示唆している。連続運転中に付着性藻類の剥離が見られることもあるが、この量は付着性藻類量に比して極微量であるため、完全混合時においては式(5)が成り立つことが確認できる。

c) アンモニア酸化細菌, 亜硝酸酸化細菌, 脱窒細菌

硝化細菌数および脱窒細菌数の定量をMPN法にて測定した結果、本定常期の菌体数は、以下であった。塩分濃度の低い培養液の履歴を持つ細菌数 (FW 0%, FW 25%, FW 50%) は、アンモニア酸化細菌: $1.4 \times 10^4 \sim 3.7 \times 10^7$ MPN/cm², 亜硝酸酸化細菌: $0 \sim 5.7 \times 10^5$ MPN/cm², 脱窒細菌: $1.7 \times 10^2 \sim 1.9 \times 10^5$ MPN/cm² であった。塩分濃度の高い培養液の履歴を持つ細菌数 (SW 50%, SW 75%, SW 100%) は、アンモニア酸化細菌: $4.0 \times 10^3 \sim 2.8 \times 10^7$ MPN/cm², 亜硝酸酸化細菌: $0 \sim 8.1 \times 10^5$ MPN/cm², 脱窒細菌: $2.0 \times 10^2 \sim 1.1 \times 10^6$ MPN/cm² であった。硝化活性は、塩分濃度が高く、希釈率が大きくなるに伴い大きくなる傾向にあったが、付着生物膜中の硝化細菌数は顕著な相違は見られなかった。Engel²³とLee²⁴らはアンモニア酸化細菌と亜硝酸酸化細菌の菌体質量を想定し、アンモニア酸化細菌では 2.4×10^{-10} mg/cell, 亜硝酸酸化細菌では 1.0×10^{-10} mg/cell であると報告している。これらの値を用いて硝化細菌の重量を概算してみた結果、アンモニア酸化細菌は $9.6 \times 10^{-7} \sim 9.0 \times 10^{-3}$ mg/cm², 亜硝酸酸化細菌は $0 \sim 8.1 \times 10^{-5}$ mg/cm² であった。

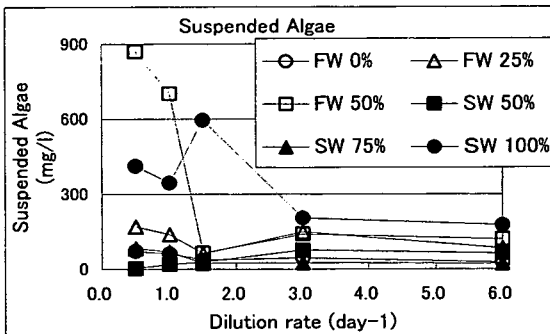
d) 比窒素摂取速度

本実験の定常期に得られたデータを基に、脱窒作用を無視した窒素収支から算出した見かけ上の生物量当たりの比窒素摂取速度式(10)は、以下の様な結果が得られた。FW 0%: 0.21~1.37 mg-N/g-SS day, FW 25%: 1.77~11.45 mg-N/g-SS day, FW 50%: 1.19~7.65 mg-N/g-SS day, SW 50%: 0.47~3.90 mg-N/g-SS day, SW 75%: 1.08~9.48 mg-N/g-SS day, SW 100%: 0.20~3.12 mg-N/g-SS day であった。塩分濃度の相違による摂取速度の顕著な傾向は得られなかったが、塩分濃度の低いFW 0%を除き、希釈率が大きくなるに伴い速度は上昇していく傾向にあった。

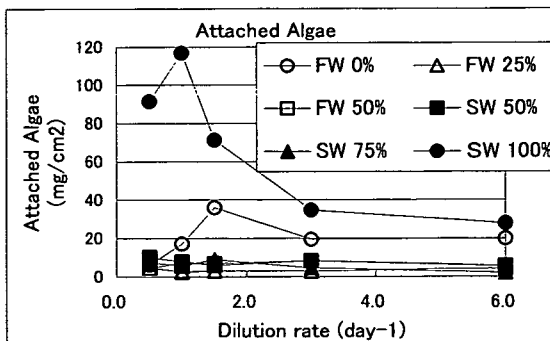
今後の課題として、付着性生物膜中では、若干、脱窒反応が進行することが予測されるため脱窒活性試験を行い、脱窒量を定量することが必要である。

5. おわりに

河川感潮域の窒素系自浄作用機構に関する知見を得るために、光照射のもとで単槽連続攪拌装置を用いて藻類、硝化細菌共存系の基礎的なモデル実験をおこなった。そ



(a) 浮遊性藻類量



(b) 付着性藻類量

図-6 浮遊性藻類量・付着性藻類量

の結果、以下のような結論を得た。

- (1) 淡水域および低塩分濃度を想定した感潮域においては、消費された $\text{NH}_4^+ \text{-N}$ の殆どは、硝化作用に比べ藻類による窒素の摂取が優占された。また、塩分濃度が高く、希釈率が大きくなるに伴い $\text{NH}_4^+ \text{-N}$ 消費速度および硝化速度・同化速度は高くなる傾向にあった。
- (2) 海域および高塩分濃度を想定した感潮域においては、希釈率が高いと硝化が優占され、希釈率が低い場合、藻類による窒素の摂取が優占された。硝化作用に関しては、塩分濃度の影響が極めて大きく、自然界とは異なって $\text{NO}_3^- \text{-N}$ まで硝化作用は進行せず、 $\text{NO}_2^- \text{-N}$ が蓄積された。亜硝酸酸化細菌はアンモニア酸化細菌より塩分濃度に対して感受性が高いと考えられた。
- (3) 藻類の優占種は、塩分濃度の低い系 (FW25%) では緑藻類 (*Ullothrix sp.*, *Chlorella sp.*)、藍藻類 (*Oscillatoria sp.*, *Phormidium sp.*) および珪藻類 (*Amphora sp.*) が介在し、塩分濃度の高い系 (SW75%) では、緑藻類 (*Chlorella sp.*)、藍藻類 (*Oscillatoria sp.*, *Phormidium sp.*) および珪藻類 (*Amphora sp.*, *Cymbella sp.*) が介在した。
- (4) 塩分濃度や希釈率に関わらず、槽内では附着性藻類量が90%程度存在し、比較的同一種の藻類が混在したと考えられた。また、硝化活性は、塩分濃度が高く、希釈率が大きくなるに伴い大きくなる傾向にあったが、附着生物膜中の硝化細菌数は顕著な相違が見られなかった。
- (5) 本実験の定常期に得られたデータを基に、脱窒作用を無視した窒素収支から算出した見かけ上の生物量当たりの比窒素摂取速度を検討した結果、塩分濃度の相違による摂取速度の顕著な傾向は得られなかったが、塩分濃度の低い FW 0%を除き、希釈率が大きくなるに伴い速度は上昇する傾向にあった。

謝辞：本研究を行うにあたり、終始ご指導頂きました元日本大学教授、東北大学名誉教授、東京大学名誉教授 松本順一郎博士、日本大学理工学部教授 松島眸博士、実験にご協力頂いた、NJS 森藤文浩氏、横浜市 山口哲司氏、藻類の同定を御指導して頂きました元日本大学生物資源科学部教授 山岸高旺博士、データの整理等でお世話になりました大学院生 関昌史氏、郡山市 鈴木勇哉氏に深く感謝の意を表わします。

参考文献

- 1) 高橋幸彦, 佐藤洋一, 黒澤幸二, 中村玄正, 牧瀬 (牧乃瀬) 統, 松本順一郎: 都市河川中流域の窒素系自浄作用に関する基礎的研究, 下水道協会誌, Vol. 37, No. 451, 2000.

- 2) 二渡了, 大石京子, 古米弘明, 楠田哲也: 強混合河川感潮部における硝化・脱窒過程に関する研究, 土木学会論文集, No. 479/II-25, pp. 101-110, 1993.
- 3) 土木学会衛生工学委員会付着微生物研究分科会報告書: 水質環境保全にはたす付着微生物の浄化能力の再評価とその効率化に関する総合的研究, 土木学会, pp. 154-157, 1986.
- 4) 白旗清伸, 吉田浩義, 中井智司, 細見正明, 村上昭彦: 河口域の干潟における脱窒能の評価, 水環境学会誌, Vol. 24, No. 11, pp. 773-777, 2001.
- 5) 徐開欽, 藤沼紀敏, 須藤隆一: 干潟システムによる養魚場排水の浄化に関する実験的研究, 環境工学研究論文集, Vol. 32, pp. 273-281, 1995.
- 6) 徐開欽, 坂口芳輝, 西村修, 田中裕作, 細見正明, 須藤隆一: 人工海浜による閉鎖性内湾の水質浄化, 環境工学研究論文集, Vol. 34, pp. 249-258, 1997.
- 7) 高橋幸彦, 牧瀬統, 池田宜男: 下水処理水及び河川水のA/GP試験について, 第39回下水道研究発表会講演集, pp. 413-415, 2002.
- 8) 社団法人 日本水環境学会: 次世代に向けた水処理技術への取り組み講演資料集, pp. 33, 2001.
- 9) Makise, H., Nakamura, M., and Matsumoto, J.: On Nitrogen Changes by Algae and Bacteria in Brackish Water, International Conference on Environment & Development, pp. 523-534, 1994.
- 10) Ohgaki, S.: Kinetics of attached microbial growth in a continuous stirred tank reactor, Water Research, Vol. 12, pp. 243-249, 1978.
- 11) 松本順一郎: 今日の下水道, 土木学会誌, pp. 2-8, 1979. 6.
- 12) Kawasaki, S., Gromiec, M. J., Hanaki, K. and Matsumoto, J.: Effect of seawater on nitrification by attached biofilm, Ecological Modelling, Vol. 32, pp. 183-190, 1986.
- 13) 秋山優, 有賀祐勝, 坂本充, 横浜康継: 藻類の生態, 内田老鶴圃, 1986.
- 14) 松尾友矩監訳: 水質環境工学, 技報堂出版, 1993
- 15) Sakamoto, M.: Arch Hydrobiol., 62, pp. 1-28, 1966
- 16) 日本下水道協会: 下水試験方法, 1984.
- 17) 土壤微生物研究会: 土壤微生物実験法, 養賢堂, pp. 438, 1981.
- 18) 微生物研究法懇談会: 微生物学実験法, 講談社, 1975.
- 19) 須藤隆一, 稲森悠平: 水処理パイオ入門, 産業用水調査会, 1994.
- 20) Jenkins, S. H.: Nitrification, Jour. WPCF., 41, (2), pp. 610-618, 1969.
- 21) 古米弘明, 上田映子: 地方中小河川における河床生物膜の成長と硝化活性について, 環境システム研究, Vol. 22, pp. 182-187, 1994.
- 22) 徐開欽, 高崎みつる, 佐藤敦久: 河床が礫で覆われた浅い都市河川の窒素挙動に関する研究, 水道協会雑誌, 第57巻,

第5号, 1988.

- 23) Engel, M. S. : The growth and autotrophic metabolism of *Nitrosomonas europaea*. University Microfilms, Inc., Ann Arbor, Mich, 1959.
- 24) Lees, H. and Simpson, J. R. : The biochemistry of the nitrifying organisms. 5. Nitrite oxidation by *Nitrobacter*, *Biochem. Jour.*, 65, pp. 297-305

(2003. 1. 9 受付)

EXPERIMENTAL STUDY ON SELF-PURIFICATION OF NITROGEN BY ATTACHED ALGAE IN A TIDAL AREA

Hajime MAKINOSE, Yukihiko TAKAHASHI and Michimasa NAKAMURA

The effects of salt concentration and dilution rates on self-purification of nitrogen were experimentally investigated by continuous stirred tank reactor. Setup conditions were the salt concentration of 0%, 25%, 50%, 75%, 100%, and HRT 4, 8, 16, 24, 48hr, it cleared a degree of participation under the coexistence of microorganisms such as algae and nitrification bacteria. Under the salinity concentration ; 1) Poor conditions when the dilution rate is low, assimilation of nitrogen by the algae was predominant. When the dilution rate is high, the nitrification by nitrifying bacteria is predominant. 2) Rich conditions when the dilution rate is low, assimilation of nitrogen by the algae was predominant. When the dilution rate is high, the nitrification by nitrifying bacteria is predominant. The response of nitrite oxidizing bacteria the was high to the salt concentration, and nitrite nitrogen accumulated it.