

微小電極法を用いた河床礫生物膜内の DO と窒素の濃度プロファイルの測定

山崎慎一¹・山口隆司²・荒木信夫³・角野晴彦⁴・大橋晶良⁵・原田秀樹⁶

¹正会員 工博 高知工業高等専門学校助教授 建設システム工学科 (〒783-8508 高知県南国市物部200-1)
E-mail:syama@ce.kochi-ct.ac.jp

²正会員 工博 呉工業高等専門学校助教授 環境都市工学科 (〒737-8506 広島県呉市阿賀南2-2-11)

³正会員 工博 長岡工業高等専門学校助教授 環境都市工学科 (〒940-8532 新潟県長岡市西片貝888)

⁴正会員 工修 岐阜工業高等専門学校助手 環境都市工学科 (〒501-0495 岐阜県本巣市上真桑2236-2)

⁵正会員 工博 長岡技術科学大学助教授 環境システム系 (〒940-2188 新潟県長岡市上富岡町1603-1)

⁶正会員 工博 長岡技術科学大学教授 環境システム系 (〒940-2188 新潟県長岡市上富岡町1603-1)

4種類の微小電極を作成して、河床礫付着生物膜内のpH、DO、アンモニア性窒素、硝酸性窒素の濃度プロファイル測定した。明条件(照度8000ルクス)の河床礫は、光合成によって生物膜表層部でDOが急激に増加したが、暗条件では、表層部からDO濃度が減少し内部で消失した。暗条件でのアンモニア性窒素消費速度は、明条件の約1/2の値であった。四万十川流域5地点の河床礫では、5地点ともに生物膜表層部からアンモニア性窒素濃度は減少し、硝酸性窒素濃度は増加した。アンモニア性窒素消費速度は、上流の志和分大橋から中流の大正流量観測所までは $0.06 \sim 0.13 \mu\text{mol}/\text{cm}^2 \cdot \text{h}$ の値を得たが、岩間橋より下流では次第に減少する傾向がみられた。

Key Words: *microelectrode, nitrogen concentration profile, photosynthesis, ammonia consumption activity, Shimanto river*

1. はじめに

河川の生物学的浄化には、主に河川底質や河床礫表面に生息する好気性細菌、硝化細菌、脱窒細菌、藻類などの微生物が関与しており、これらの微生物は、河川水中の有機物除去、有機性窒素の無機性窒素への変換と除去(藻類の場合は摂取)を行っていると考えられている。しかし、実際の河床底質や厚さ数mm程度の礫表面に付着した生物膜内において、酸素供給や窒素変換などが実際どの様に行われているかについては、これまでの測定技術では解析が困難であり、今なお不明な点が残されている。

しかし近年、微小空間の物質濃度を比較的瞬時に定量することができる様々な微小電極が医学、生物学の分野で急速に開発され、環境工学の分野においても1980年頃から、自然水域の堆積物^{1)~3)}、散水ろ床や回転円板に付着した生物膜^{4)~7)}、生物反応槽で形成した微生物フロックや凝集体^{8)~12)}などの生態解析に新規な評価手法として応用されてきている。なかでもRevsbechらは、湖沼の堆積物中の酸素拡散と硫

化水素の発生挙動や散水ろ床付着生物膜内の脱窒と酸素呼吸の反応構造について^{11)~13)}、佐藤らは、好気性微生物膜やフロック内のアンモニア酸化や酸素消費の機構について^{8)~10)}、Lensらや大橋らは、UASB反応槽グラニューール汚泥内のpH挙動や基質反応形態について検討している^{11)~12)}。

そこで本研究は、pH、溶存酸素(DO)、アンモニア、硝酸の4種類の微小電極を作成し、これまでブラックボックスとされていた河川水中の礫表面に付着した生物膜内部のDOや窒素の空間的挙動を把握することを目的として、礫表面への光照射の有無による生物膜内のDO、アンモニア性窒素、硝酸性窒素の濃度プロファイル測定した。また、この窒素濃度プロファイルから求められる単位礫表面積当たりの窒素消費速度は、河川の窒素除去能力を評価するための有効な指標の一つと考えられる。ただし、微小電極での測定条件が実際の河川環境と水質や流速などの点で異なるため実際の消費速度の評価は難しいが、潜在的な消費速度を流域間で相対比較する場合に有効といえる。そこで、高知県四万十川の上流から下流

の5地点から採取した河床礫の濃度プロファイルを測定し、アンモニア性窒素消費速度を比較した。

2. 実験方法

(1) 供試河床礫

光照射の有無によるDOと窒素の濃度プロファイルの測定には、高知県の一級河川物部川（流域面積508km²、流路延長71km、環境基準A類型）の下流（河口より2.5km上流の新物部川橋）から採取した河床礫を使用した。また、四万十川流域におけるアンモニア性窒素消費速度の比較には、図-1に示した高知県の一級河川四万十川（流域面積2270km²、流路延長196km、環境基準AA類型）の上流（志和分大橋、窪川橋）、中流（大正流量観測所、岩間橋）、下流（四万十川橋）から採取した河床礫を使用した。採取条件として、日当たりの良好な水深20～30cmの河床から、礫表面に生物膜が比較的均一に附着し、長期間移動していないと思われる直径20～30cm程度のものを選定して採取した。

(2) 微小電極の作成方法と性能

pH、アンモニウム、硝酸の微小電極は、各々の電極の先端にイオン交換液膜が充填されており、参照電極とともに試料溶液中に浸漬したときに生じる電位差からイオン濃度を定量する。これらの微小電極はBeerら¹³⁹⁻¹⁴³の方法を参考にして作成した。作成方法は、まず、100μlのガラス管をマイクロピペットテンション（島津製MPT-1）によって先端径を約10μmになるように切断する。ガラス管先端部にシラン処理溶液（四塩化炭素に20%(W/W) Trimethyl chloro silaneを混合した溶液）を充填し、130℃の恒温槽で乾燥させる。最後に、ガラス管先端部にイオン交換液膜溶液、胴体部に電解質溶液を充填し、0.3φmmAg線にClメッキしたAg/AgCl線を電解質溶液中に挿入して作成する。なお、pH微小電極のイオン交換液膜溶液は、2-Nitrophenyl octyl etherに10%(W/V) Tridodecyl amineと0.7%(W/V) sodium tetraphenyl borateを溶解した液、アンモニウム微小電極の場合は、2-Nitrophenyl octyl etherに10%(W/V) Ammonium Ionophore I (Fluka 09877)と1%(W/V) sodium tetraphenyl borateを溶解させた液、硝酸微小電極の場合は、Nitrate Ionophore-Cocktail A (Fluka 72549)を使用した。

DO微小電極は、試料溶液中に浸漬したときに電極先端のシリコン膜から透過するDOが金メッキした白金電極表面で還元され、この時に発生する電流値

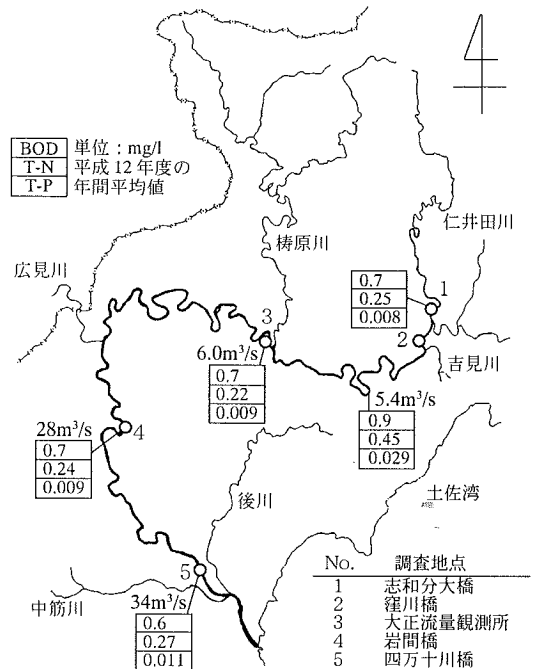


図-1 四万十川流域の河床礫採取地点

からDO濃度を定量する。このDO微小電極はRevsbechら¹⁶⁰⁻¹⁸⁰の方法を参考にして作成した。DO微小電極は、白金電極と外部ケーシング管で構成され、白金電極は、10μlのガラス管に0.1φmm白金線を挿入し、マイクロピペットテンションでガラス管と白金線を融合させながら切断する。先端部の白金線を100μm程度露出させ、5%KAu(CN)₂溶液を用いて金メッキを施す。ケーシング管は、外径3mmのガラス管を使用し、パーナーで切断して先端径を50～100μmに整形する。先端部にシリコン膜（膜厚100μm以下）、胴体部に電解質溶液を充填し、最後に、白金電極と参照電極用のAg/AgCl線をケーシング管に挿入して作成する。

微小電極の性能に関して、pH電極はpH4～9、アンモニウムと硝酸の電極は10⁻⁵～10⁻¹mol/l (0.14～1400mgN/l)の範囲でr²=0.99以上の高い相関性を有する直線関係を得ている。電位差の傾き（ネルンスト係数）も25℃において59.2mV（硝酸の場合は-59.2mV）にほぼ等しい値となっている。電極の応答時間は、3種の電極ともに数秒以内であるが、アンモニウムと硝酸の電極では、10⁻⁵mol/lより窒素濃度が薄くなると応答時間が遅くなる傾向がある。

DO微小電極についても、DO0～8mg/lの範囲でr²=0.99以上の高い相関性を有している。しかし、作成した電極毎にケーシング管先端部のシリコン膜の厚みやシリコン膜と白金電極先端の距離に微妙な違

いが生じるために、電流値の傾きが異なり、応答時間も数十秒～数分の間で相違した。よって、プロファイルの測定には、応答が比較的高くて早いものを選択して使用した。

(3) 濃度プロファイルの測定方法

図-2に河床礫附着生物膜内のpH、アンモニア性窒素、硝酸性窒素の濃度プロファイル測定装置を示す。DOの濃度プロファイル測定装置は、図-2に示した参照電極と電位差計(TOADKK製 HM-30S)の代わりに、0.7Vに変圧されたバッテリーと電流計(TOADKK製 PM-18U)を備えている以外は同様の装置である。表-1に培地組成を示す。培地の成分濃度は、生物膜内の濃度変化を明瞭に捉えることができるように高めに設定し、グルコース20 mg/l、アンモニア性窒素5 mg/lおよびP, Mg, Caなどを含む培地を10 l満たした。培地温度を25℃、DO濃度を8mg/l以上に維持させ、その中に河床礫を静止させた。河床礫表面の液流速は、散気によるエアリフト循環流を生じさせて0.5～1cm/sとした。

培地液面における照度は、屋外に近い照度に設定する予定であったが、投光機による照射では10000ルクス以上になると水温の一定制御が困難であったため、光照射の有無による実験では、明条件を昼間の雨天時の照度よりやや低めの8000ルクスに調整し、暗条件は水槽を遮光して設定した。また、四万十川流

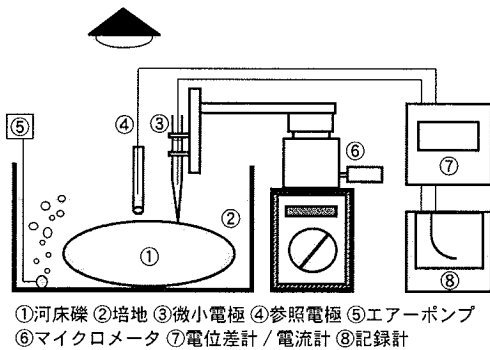


図-2 河床礫附着生物膜内のpH、アンモニア性窒素、硝酸性窒素の濃度プロファイル測定装置

表-1 培地組成

グルコース	20	mg/l
NH ₄ Cl	19	mg/l
K ₂ HPO ₄	21.75	mg/l
KH ₂ PO ₄	8.5	mg/l
Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O	44.6	mg/l
MgSO ₄ ·7H ₂ O	22.5	mg/l
CaCl ₂	27.5	mg/l
FeCl ₃ ·6H ₂ O	0.25	mg/l

域における窒素消費速度の比較実験においても、水温制御の関係で照度を2000ルクスに調整した。

この状態で6時間放置後、検量線を作成した各々の微小電極をマイクロメーター(中央精機製 C-67)に取り付け、電極先端を礫表面から生物膜内部へ50あるいは100 μmづつ挿入した。各挿入位置での電位差(あるいは電流値)をもとに、検量線から物質濃度を換算して、濃度プロファイルの評価した。なお各実験条件における測定は1条件につき3回づつ行い、1回の測定毎に新しい電極と交換した。

アンモニア性窒素消費速度は、アンモニア性窒素の生物膜表面から内部への直線的な濃度プロファイルからFickの拡散方程式により求め、礫表面積で除して算出した。なお、拡散係数は、消費速度を評価した表層からその内部500 μm程度の範囲では顕著な間隙率の変化がみられなかったことより、この範囲の拡散係数は一定と仮定し、25℃におけるアンモニアの拡散係数は $1.41 \times 10^{-5} \text{cm}^2/\text{s}$ とした¹⁶⁾。

3. 実験結果および考察

(1) 光照射の有無による河床礫生物膜内のDOと窒素の挙動

図-3に物部川下流(新物部川橋)の河床礫を用いた明条件(照度8000ルクス)と暗条件における生物膜内のpH、DO、アンモニア性窒素、硝酸性窒素の濃度プロファイルを示す。図中の挿入距離0mmの境界線は生物膜表層を示し、境界線の右側が生物膜内部を示している。河床礫生物膜内のDO濃度のプロファイルは、明条件と暗条件で相反する挙動を示した。明条件におけるDO濃度は、河床礫に附着した藻類の光合成によって生物膜表層で急激に増加し、そして生物膜内部で次第に減少した。この生物膜内部でDOが減少した要因は、好気性細菌や硝化細菌による有機物分解や硝化反応によるものと考えられる。一方、暗条件においては、光合成が抑制され、好気性細菌や硝化細菌の反応によって生物膜表層部からDO濃度が減少し、内部でDOが消失した。暗条件では、生物膜内部あるいは日光の当たらない礫裏側で脱窒反応が生じる可能性もあると推察される。pHプロファイルについては、明条件において、光合成によるOHイオンの生成によって、表層部から内部に向かって若干上昇する傾向がみられた。

アンモニア性窒素濃度は、表層部から内部に向かってともに減少傾向を示したが、その減少量は暗条件と比較して明条件で若干多くなっている(アンモニア性窒素消費速度は、明条件で $0.04 \sim 0.06 \mu$

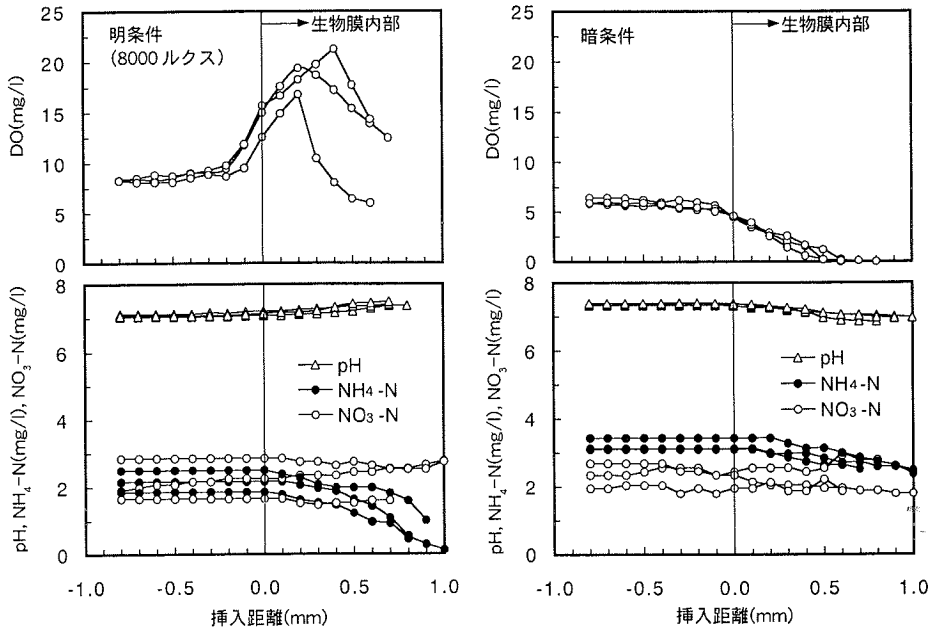


図-3 物部川下流（新物部川橋）における河床礫付着生物膜内のDO、pH、アンモニア性窒素、硝酸性窒素の濃度プロファイル

mol/cm²・h、暗条件で0.02～0.04 μmol/cm²・h)。この減少量の差は、光合成によるアンモニア摂取量の違いによるものと考えられる。

硝酸性窒素濃度は、明・暗条件ともに著しい濃度変化はみられなかった。明条件では、硝化により生成した硝酸量と同量の硝酸が藻類に摂取されているのではないかと、また、暗条件では硝化で生成した硝酸が脱窒しているのではないかなど、幾つかの理由が推測されるが、確かな原因については不明である。

以上より、明条件では、生物膜表層部で藻類が活発に光合成を行ってアンモニアを摂取し、また同時に、生物膜内部の微生物にDOを供給していることが判明した。一方、暗条件では、明条件に比べてアンモニアの減少量は少なく、また生物膜内部での脱窒反応の可能性も示唆された。

(2) 四万十川流域におけるアンモニア性窒素消費速度の比較

図-4に四万十川流域5地点における河床礫付着生物膜内のpH、アンモニア性窒素、硝酸性窒素の濃度プロファイルを示す。pHプロファイルは、5地点ともに生物膜表層部から内部に向かって若干の増加傾向を示した。

生物膜内のアンモニア性窒素は、5地点ともに生物膜表層部から次第に減少し、また硝酸性窒素については増加傾向を示した。これは生物膜内での硝化反応あるいは藻類への摂取によるものと考えられる。

また、生物膜内部における硝酸性窒素の増加量は、アンモニア性窒素の減少量に対して、5地点ともに5%程度であったことから、減少したアンモニア（あるいはその硝化によって生成された硝酸）の約95%は、主に藻類に摂取されていると推察される。

表-2に流域5地点におけるアンモニア性窒素消費速度を示す。志和分大橋、窪川橋、大正流量観測所におけるアンモニア性窒素消費速度は0.06～0.13 μmol/cm²・hに対して、その下流の岩間橋では約1/2、最下流の四万十川橋では約1/3の値が得られた。上流から中流の大正流量観測所までは窒素の除去能力に変化はないと思われるが、岩間橋より下流では次第に低下していくことが判明した。筆者らは、本実験と同じ測定地点から採取した礫を本実験と同様の培地の入った樹脂製容器に入れて光を照射し、培地中のアンモニア性窒素濃度を経時的に分析して消費速度を回分的に測定している。その結果においても、岩

表-2 四万十川流域5地点におけるアンモニア性窒素消費速度の比較

測定地点	アンモニア性窒素消費速度 (μmol/cm ² ・h)
志和分大橋	0.06～0.13
窪川橋	0.08～0.09
大正流量観測所	0.07～0.10
岩間橋	0.04～0.06
四万十川橋	0.02～0.04

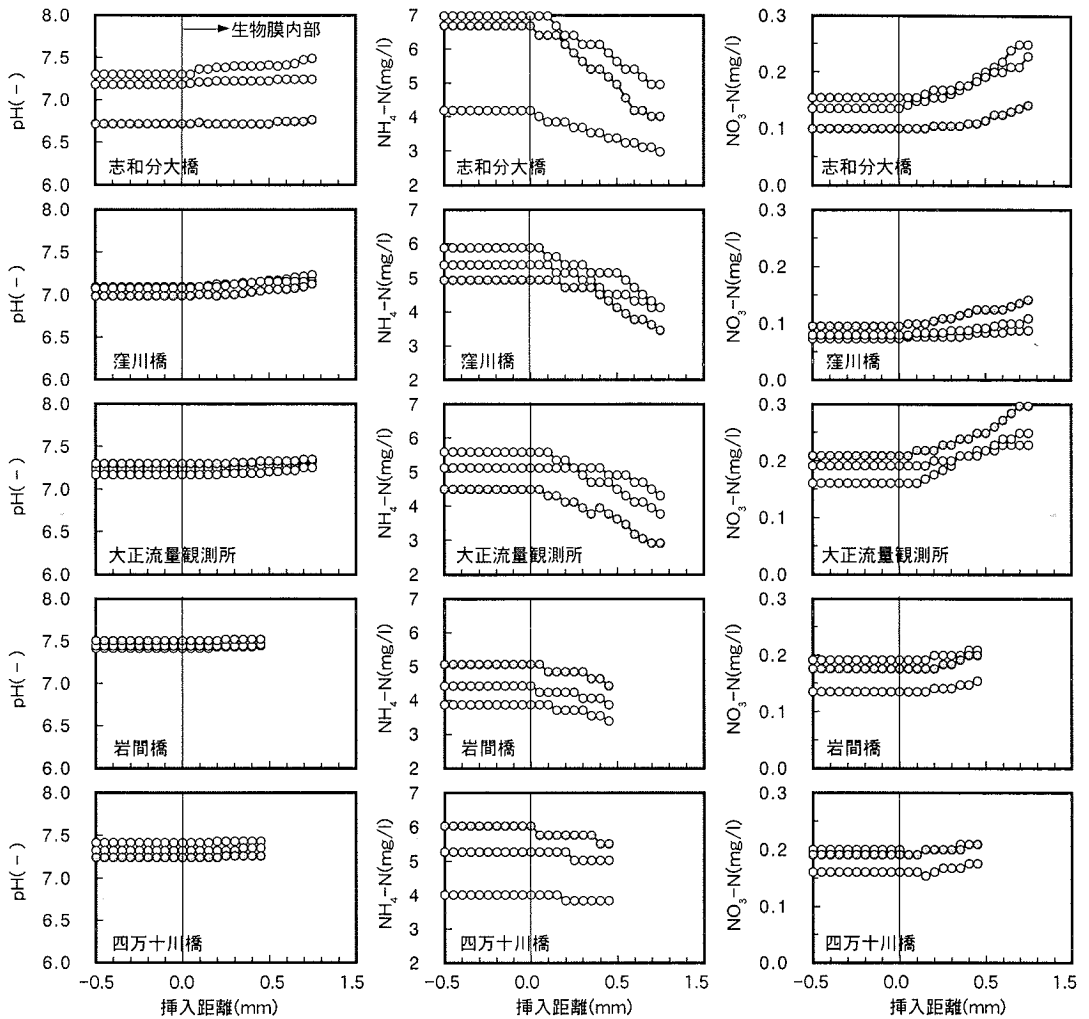


図-4 四万十川流域5地点における河床礫付着生物膜内のpH, アンモニア性窒素, 硝酸性窒素の濃度プロファイルの比較

間橋より下流の礫のアンモニア性窒素消費速度は、その上流の志和分大橋、窪川橋、大正流量観測所の1/3~1/4の値であったことを確認している¹⁹⁾。このアンモニア性窒素消費速度の低下には様々な要因が考えられ特定はできないが、下流の礫ほど生物膜が薄く、藻類などの付着量も少ないことを観察している。

4. まとめ

4種類の微小電極を作成して、河床礫付着生物膜内のpH, DO, アンモニア性窒素, 硝酸性窒素の濃度プロファイルを測定し、以下の知見を得た。

(1) 物部川下流の河床礫を用いて、明条件(照度8000ルクス)と暗条件下で生物膜内濃度プロファイル

を測定した。その結果、明条件では、河床礫に付着した藻類の光合成によって生物膜表層部でDOが急激に増加したが、暗条件では、表層部からDO濃度が減少し、内部で消失した。アンモニア性窒素濃度は、表層部から内部に向かってともに減少したが、暗条件での消費速度は、明条件の約1/2の値であった。

(2) 四万十川流域5地点の河床礫を用いて、生物膜内濃度プロファイルを測定し、アンモニア性窒素消費速度を比較した。その結果、上流の志和分大橋、窪川橋から中流の大正流量観測所までは $0.06 \sim 0.13 \mu\text{mol}/\text{cm}^2 \cdot \text{h}$ で変化はみられなかったが、岩間橋より下流では次第に減少する傾向がみられた。

謝辞：本研究は、高知県受託研究(課題名：四万十川

における生物学的自浄能力の診断)の助成を受けて遂行した。記して深謝いたします。

参考文献

- 1) Revsbech, N.P., Jorgensen, B.B. and Blackburn, T.H. : Microelectrode studies of the photosynthesis and O_2 , H_2S and pH profiles of a microbial mat, *Limnol. Oceanogr.*, 28(6), pp.1062-1074, 1983.
- 2) 中村由行, 井上徹教, K.Fatos., 左山幹雄 : 微小酸素電極を用いた濃度境界層の微細構造の把握, 海岸工学論文集, 43, pp.1081-1085, 1996.
- 3) Damgaard, L.R., Revsbech, N.P. and Reichardt, W. : Use of an oxygen-insensitive microscale biosensor for methane to measure methane concentration profiles in a rice paddy, *Appl. Environ. Microbiol.*, 64(3), pp.864-870, 1998.
- 4) Revsbech, N.P., Christensen, P.B., Nielsen, L.P. and Sorensen, J. : Denitrification in a trickling filter biofilm studied by a microsensor for oxygen and nitrous oxide, *Wat. Res.*, 23(7), pp.867-871, 1989.
- 5) Nielsen, L.P., Christensen, P.B., Revsbech, N.P. and Sorensen, J. : Denitrification and oxygen respiration in biofilms studied with a microsensor for nitrous oxide and oxygen, *Microb. Ecol.*, 19, pp.63-72, 1990.
- 6) Glud, R.N., Ramsing, N.B. and Revsbech, N.P. : Photosynthesis and photosynthesis-coupled respiration in natural biofilms quantified with oxygen microsensors, *J. Phycol.*, 28, pp.51-60, 1992.
- 7) Ramsing, N.B., Kuhl, M. and Jorgensen, B.B. : Distribution of sulfate-reducing bacteria, O_2 , and H_2S in photosynthetic biofilms determined by oligonucleotide probes and microelectrodes, *Appl. Environ. Microbiol.*, 59(11), pp.3840-3849, 1993.
- 8) 佐藤 久, 岡部 聡, 渡辺義公 : 微小電極および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), pp.206-214, 1999.
- 9) 佐藤 久, 中村吉志, 小野英樹 : 微小電極を用いた活性汚泥内の酸素消費機構の解析, 水環境学会誌, 25(1), pp.27-32, 2002.
- 10) de Beer, D., Huisman, J.W., van den Heuvel, J.C. and Ottengraf, S.P.P. : The effect of pH profiles in methanogenic aggregates on the kinetics of acetate conversion, *Wat. Res.*, 26(10), pp.1329-1336, 1992.
- 11) Lens, P., de Beer, D., Cronenberg, C., Ottengraf, S. and Verstraete, W. : The use of microsensors to determine population distributions in UASB aggregates, *Wat. Sci. Tech.*, 31(1), pp.273-280, 1995.
- 12) 大橋晶良, 渡辺 亮, 原田秀樹 : 微小電極と数学的モデルによる嫌気性微生物グラニューール内の基質濃度とpHプロファイルの評価, 環境工学研究論文集, 33, pp.235-245, 1996.
- 13) de Beer, D. and van den Heuvel, J.C. : Gradients in immobilized biological systems, *Analytica. Chimica. Acta.*, 213, pp.259-265, 1988.
- 14) de Beer, D. and van den Heuvel, J.C. : Response of ammonium-selective microelectrodes based on the neutral carrier nonactin, *Talanta*, 35(9), pp.728-730, 1988.
- 15) de Beer, D. : Measurement of nitrate gradients with an ion selective microelectrode, *Analytica Chimica Acta*, 219, pp.351-356, 1989.
- 16) Revsbech, N.P. : An oxygen microsensor with a guard cathode, *Limnol. Oceanogr.*, 34(2), pp.474-478, 1989.
- 17) Revsbech, N.P., Nielsen, L.P., Christensen, P.B. and Sorensen, J. : Combined oxygen and nitrous oxide microsensor for denitrification studies, *Appl. Environ. Microbiol.*, 54(9), pp.2245-2249, 1988.
- 18) Revsbech, N.P. and Ward, D.M. : Oxygen microelectrode that is insensitive to medium chemical composition : Use in an acid microbial mat dominated by cyanidium caldarium, *Appl. Environ. Microbiol.*, 45(3), pp.755-759, 1983.
- 19) 川内秀夫, 山崎慎一, 山口隆司, 原田秀樹 : 四万十川における河床礫付着微生物の窒素除去性能の調査, 平成10年度土木学会四国支部技術研究発表会講演概要集, pp.502-503, 1998.

(2003.12.15 受付)

MEASUREMENTS OF OXYGEN AND NITROGEN PROFILES IN ATTACHED BIOFILM ON RIVER ROCKS BY THE USE OF MICROELECTRODES

Shinichi YAMAZAKI, Takashi YAMAGUCHI, Nobuo ARAKI, Haruhiko SUMINO, Akiyoshi OHASHI and Hideki HARADA

pH, O_2 , ammonia and nitrate concentration profiles contained in the attached biofilm on river rocks were measured with microelectrodes. The photosynthesis under the bright lux condition (8000 lux) promoted the rapid O_2 concentration increase on the surface of the biofilm. Ammonia consumption activity under the bright lux condition was about twice as much active as under the dark lux condition. As for the attached biofilm on the riverbed rocks obtained from 5 spots in Shimanto river basin, ammonia consumption activity of the rock collected from the upstream was 0.06 - 0.13 $\mu\text{mol}/\text{cm}^2\cdot\text{h}$, which showed more active value than that of the downstream.