

# 汚濁池沼への酸素供給が有機物分解および微生物群集へ与える影響

千賀 有希子\* 渡辺 泰徳\*

キーワード：水域への酸素供給、有機物分解、微生物群集、有機汚濁

## 1. はじめに

水域における溶存酸素 (DO) は、水生生物の呼吸、微生物による好氣的有機物分解および還元性化学物質の酸化などによって消費される。これらの過程による DO の消費速度が水中への酸素の供給を上回る時、水域の貧酸素化が引き起こされる。酸素の水への溶解度は低く (冷たく酸素を十分に含んだ水でも、その溶存量は同じ容積の空気に含まれている酸素の 5% 以下)、なおかつ大気中の酸素分圧が比較的低い (0.21 気圧) ことから、水域の DO の欠乏は頻繁に起こる (Horn and Goldman 1983)。DO が欠乏した水中では、 $H_2S$  や  $Fe^{2+}$  など還元性化学物質の蓄積が起こり、水生生物の死が頻発する。さらに、長期にわたる無酸素化は、好気性有機物分解が十分に進行せず、未分解の有機物が蓄積し水質を著しく悪化させる。

これまでに貧酸素化した水域を改善する試みがいくつも提案されており、バブリングすることによって空気や純酸素を供給する方法 (Huttunen et al. 2001 ; Tsukada et al. 2006 ; Gantzer et al. 2009) や湖水の躍層の破壊を避けるために酸素が飽和している表層水を送り込む方法 (Ashiley 1988) などが開発され実施されてきた。近年では、圧力をかけて多量の酸素を水に溶け込ませた高圧酸素水を、無酸素化した底層に送り込む方法 (WEP システム、松江土建株式会社) が開発され注目されている。この方法は、水圧を利用するため酸素の溶解効率が非常に高い、高濃度の DO を含んだ水を水平に拡散できる、底泥を巻き上げる水泡を発生しないなど多くの利点を持つ。低下した DO についても比較的短時間で回復できると報告されている。しかしながら、供給される DO は、非常に高濃度 (大気平衡時の 2 ~ 3 倍) である。特に一次生産が起こらない湖の底層には存在しえないほど高い溶存酸素環境を形成することとなる。この

ような環境下で、物質循環がどのように影響を受けるのかについての研究は行われていない。

水域における有機物分解は、栄養塩の回帰および底泥の堆積速度に大きく関与し、水質や一次生産などの物質循環を決定する重要な過程である。本研究では、高溶存酸素環境が有機物分解に与える影響を明らかにするために、室内実験において試水に純酸素をバブリングすることで高溶存酸素環境下をつくり、その試水中の有機物量を時間を追って測定した。有機物分解は、溶存有機炭素 (DOC) の減少を指標とした。また、水域における好氣的有機物分解は主に従属栄養微生物によって行われる。このことから、高溶存酸素環境が微生物に与える影響を、蛍光染色した微生物を蛍光顕微鏡下で観察・計数するとともに、標準寒天培地によって培養した従属栄養細菌のコロニーについても観察・計数し検討した。

## 2. 方法

### 2-1. 試水の調製

実験には、生活排水の流入をうけ有機汚濁が進んだ池 (立正大学構内、パドマ池) を用いた。この池水に有機物あるいは窒素源としてグルコース ( $5 \text{ mgC L}^{-1}$ ) とアスパラギン酸ナトリウム ( $0.5 \text{ mgN L}^{-1}$ ) を加え、さらに汚濁化した試水を調製した。実験開始時における汚濁水の組成を表 1 に示す。この試水を 2 L の透明ポリビ

表 1. 人工有機汚濁水の組成

	濃度
$NH_4^+$	$0.1 \text{ mgN l}^{-1}$
$NO_2^-$	$0.2 \text{ mgN l}^{-1}$
$NO_3^-$	$0.8 \text{ mgN l}^{-1}$
全有機窒素 (TON)	$4.2 \text{ mgN l}^{-1}$
溶存有機炭素 (DOC)	$16.4 \text{ mgC l}^{-1}$

\* 立正大学地球環境科学部環境システム学科

2009年度立正大学大学院地球環境科学研究科オープンリサーチセンター業績

ン9本に1.8Lずつ分取した。常時エアポンプ (MP-2N, Shibata) でエアレーションを行ったポリピン (Air)、酸素ガス発生装置 (オージネーター600、近畿酸素) で >90%酸素バブリングを行ったポリピン (O<sub>2</sub>)、および何もバブリングしなかったポリピン (Control) を3本ずつ調製した。空気と酸素の供給はガラスストーンを経て約 1 L min<sup>-1</sup>で行った。これらのポリピンを実験期間中25℃、暗条件下に静置し、溶存酸素濃度 (DO)、溶存有機態炭素 (DOC)、生菌数および全菌数を測定するためにポリピン中の水を経時的に採取した。採水時には、懸濁物が一定となるようによく撈拌した。

## 2 - 2 . 測定と解析

溶存酸素は、水サンプルを採取する前に蛍光式酸素計 (HQ3d, HACH) で測定した。DOC濃度は、採水した水をガラス繊維ろ紙 (GF/F, Whatman) でろ過後、TOC計 (TOC-5000A, Shimadzu) で測定した。全菌数は、ろ過をしない水サンプルにグルタルアルデヒドを2%添加し生物を固定した後、DAPI (4'-6-diamidino-2-phenylindole) で染色し蛍光顕微鏡下で観察し計数した。生菌数は、標準寒天培地 (日水製薬株式会社) を用い、25℃、暗条件下で2週間培養し、出現したコロニーを観察後、計数した。測定値の多重比較検定には、Turkey-Kramer法 (StatView software Version J 5.0, SAS Institute) を用いた。

## 3 . 結果および考察

実験期間中の DO は、Control で70~80%、Air でほぼ100%、O<sub>2</sub>で200~300%であった (図1)。これらの結果は、未飽和、飽和および過飽和と3種類の DO 環境が形成されていたことを示している。O<sub>2</sub>の DO 濃度は、バブリングを停止してから気泡が消えるのを待って測定したため、酸素ガス発生装置稼働時には実際にはもっと DO 濃度は高かったと推察される。Control の DO は、3日目で大きく減少した。これは、有機物分解が3日までで大きく進行しており (図2)、これにともなう酸素消費の結果であったと考えられた。

どのサンプルも DOC は、時間とともに減少した (図2)。Air と O<sub>2</sub>の DOC は4日目、Control は5日目まで大きな減少傾向にあり、その後は緩やかに減少した。Air と O<sub>2</sub>の減少に比べると Control の減少が遅かったことから、有機物分解は空気および酸素の供給によって促進されることが示された。この結果は、好気的環境が

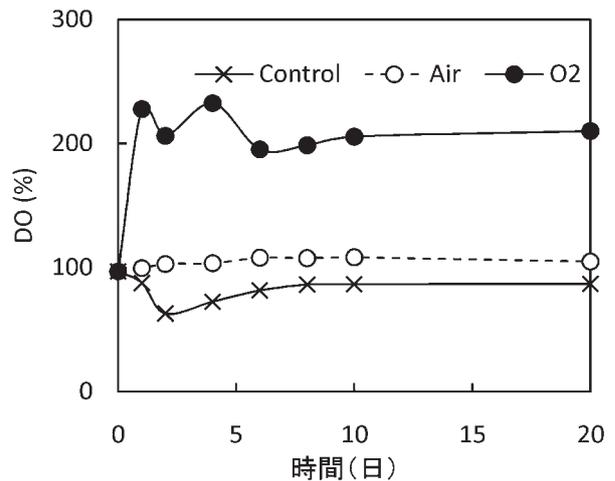


図1. 溶存酸素濃度 (DO) の経時変化

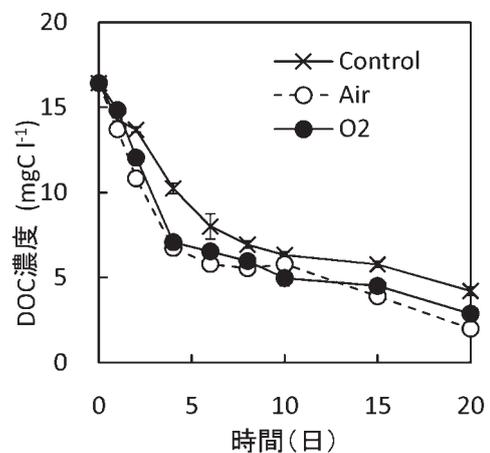


図2. 溶存有機態炭素 (DOC) 濃度の経時変化

有機物分解を促進することを示している。屋外に底泥と地水をいれて空気供給の影響を観た実験においても、何も供給しない水槽の水中の有機物 (DOC + 懸濁態有機炭素 (POC)) は80日経っても減少しなかったのに対して、空気供給をおこなった水槽では約半分に減少した (千賀と渡辺 2008, 2009)。有機物の分解には、好氣的に進行する過程 (好気性の一般細菌ら) と嫌氣的に進行する過程 (脱窒細菌、硫酸還元菌、鉄細菌など) がある。どちらの分解過程が有意であるのかは議論的であるが、一般的には好氣的分解の方が有意であると言われている (Holmer 1999 ; Romantschuk et al. 2000 ; Gallizia et al. 2004)。我々の結果は、この見解に準ずる。

Air と O<sub>2</sub>の供給条件では DOC の減少に有意な差は観られなかった。この結果は、ある一定以上の酸素を供給しても、好氣的有機物分解が特に活発化するわけではないことを示している。本実験では、何故過剰に酸素を供給した水中内で有機物分解が活性化されなかったのか

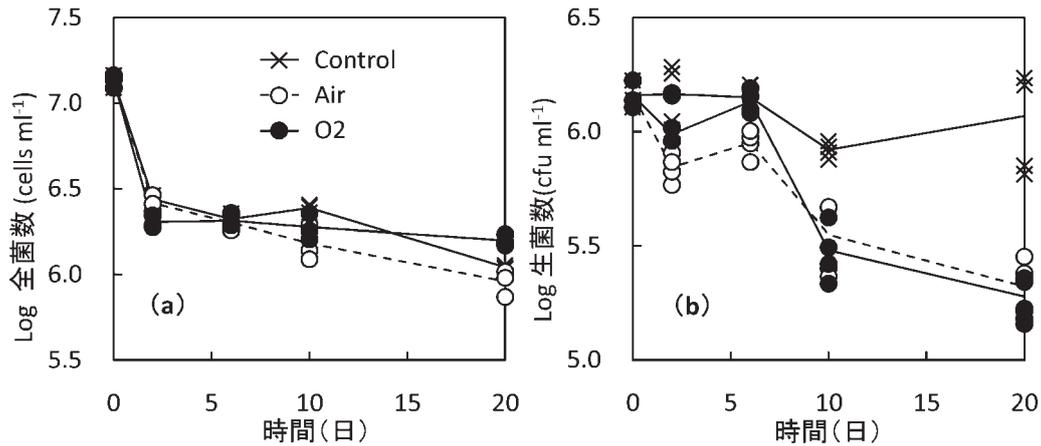


図3. 全菌数 (a) と生菌数 (b) の経時変化

ははっきりと明らかにできなかった。過剰な酸素は活性酸素となりうることから、分解を担う好気性細菌が一部阻害された可能性もある。

全菌数は、どのサンプルも2日目まで減少し、その後ほぼ一定であった(図3 - a)。サンプル間に大きな差は見られなかった。AirとO<sub>2</sub>の生菌数は、10日以降大きく減少した(図3 - b)。AirとControlの生菌数に大きな差は見られなかった。Controlは、実験期間中ほぼ一定であった。全菌数は死滅した細菌や活性をもたない細菌も計数してしまうが、生菌数はある程度活性をもった細菌を計数することができる(但し、用いた培地上で生育できるものに限る)。10日目の生菌数の減少は、バブリングによる攪拌によって付着性の細菌の生育が阻害されたことが推測された。全菌数と生菌数の結果から、空気または酸素を供給することによって細菌は大きく増殖するわけではないことが解った。この結果は、有機物分解が空気を供給した場合も酸素を供給した場合も大きな差がなかったという結果を補足するものと考えられた。

蛍光顕微鏡での観察によって、Controlの細菌の形態は6日目に長さが数100mm以上の糸状性細菌が増え、10日目には糸状性細菌は大きく減少しサイズの小さな桿菌や球菌が優先することが解った(図4)。これは、実験初期に大きく増殖した糸状性細菌が、10日目には原生動物などによって捕食され、減少したと考えられた。AirとO<sub>2</sub>の糸状性の細菌は6日目、10日目においても検出された(図4)。一般的に大型の原生動物は攪拌によって生育が阻害される可能性がある。そのため、バブリングを行ったAirとO<sub>2</sub>では、大きな糸状性細菌が残っていたものと考えられた。両サンプルにおける細菌形態の変化はほぼ同じであった。しかしながら、Controlとは異なっていた。細菌数制限の一因として原生動物によ

る捕食があげられる(Watanabe 1975; 渡辺 1990)。この形態の差が、細菌を捕食するものの存在によって影響されるのであれば、今後は細菌の捕食者への酸素供給の影響も検討する必要があるだろう。

標準寒天培地上に出現したコロニーは、0日目は黄色いコロニーが優占していた(図5)。2日目には、ControlとAirでピンクのコロニーが、O<sub>2</sub>でピンクと赤いコロニーが優占した。6日目のControlとAirでは黄色と白(薄ピンク)のコロニーの優占に変化し、O<sub>2</sub>では赤いコロニーが優占したままであった。ControlとAirでの優占種はほぼ同じであったが、O<sub>2</sub>は異なっていたと考えられる。本研究では、出現したコロニーを同定するまでには至らなかったが、コロニーの色や形態からO<sub>2</sub>のコロニーは明らかに他のサンプルと異なっていた。この結果は、酸素の供給によって優先する好気性細菌が異なることを示している。水中の物質循環は主に微生物によって行われている。したがって、優占する細菌が変わるとことは、微生物ループによってつながっている細菌以外の微生物群集にも影響を与え、結果として物質循環を大きく変える可能性がある。

21世紀は水の世紀ともいわれ、水問題は社会の大きな関心ごとになってきている(島谷ら 2003)。世界的にみても閉鎖性水域の富栄養化やそれともなう水域生態系の劣化など水質をめぐる問題は改善されていない。近年、水質改善に向けた技術の開発が注目されている。本研究で注目した酸素を貧酸素水へ供給する方法は水質改善に向けた技術開発の1つであり、さらなる発展が期待されている。水域生態系の基本原理および保全を念頭に、いつ、どのように貧酸素水に酸素を供給するかを重点的に検討していく必要があるだろう。我々は、本研究によって有機物分解が高溶存酸素環境下であっても溶存酸素飽

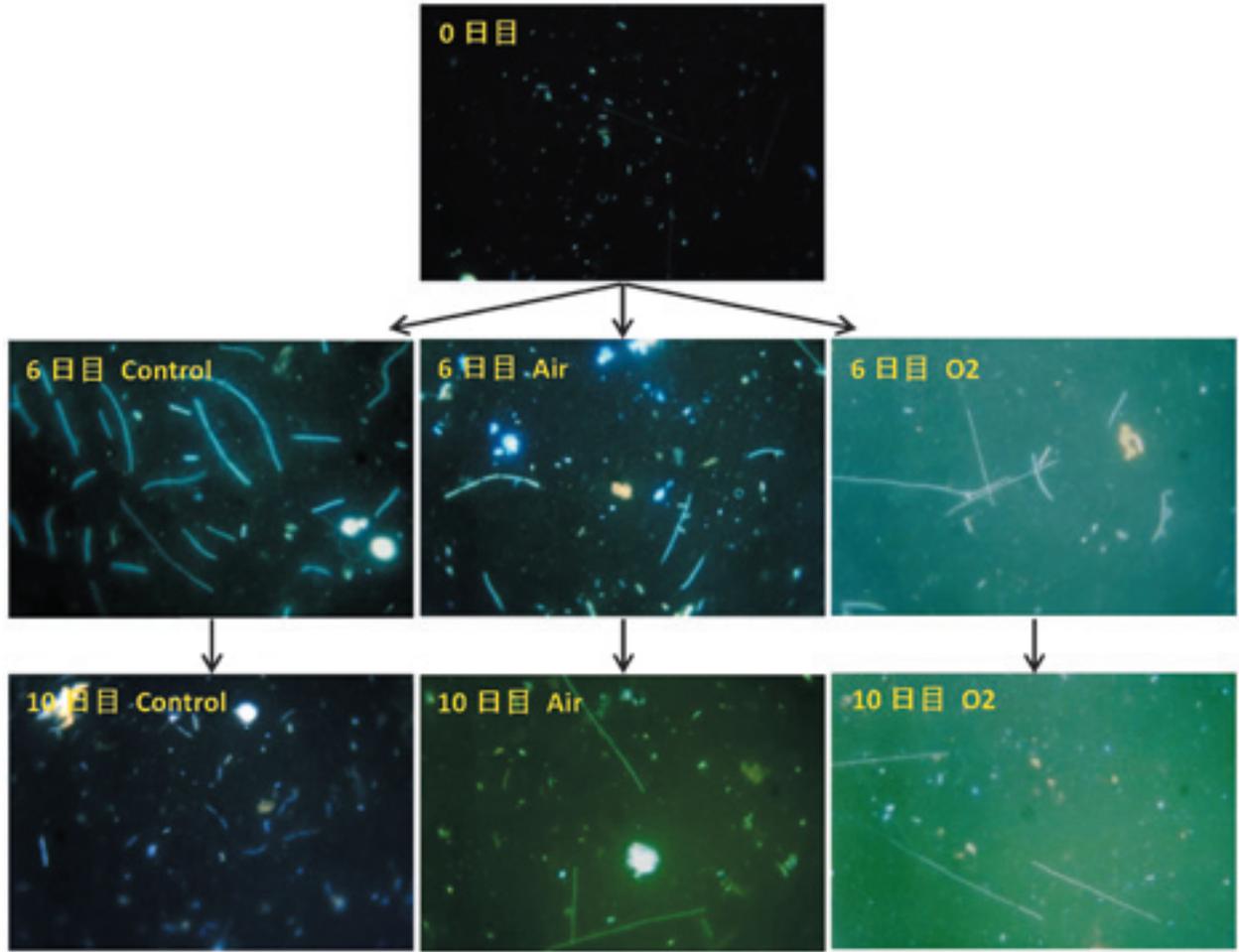


図4. DAPI 染色による細菌形態

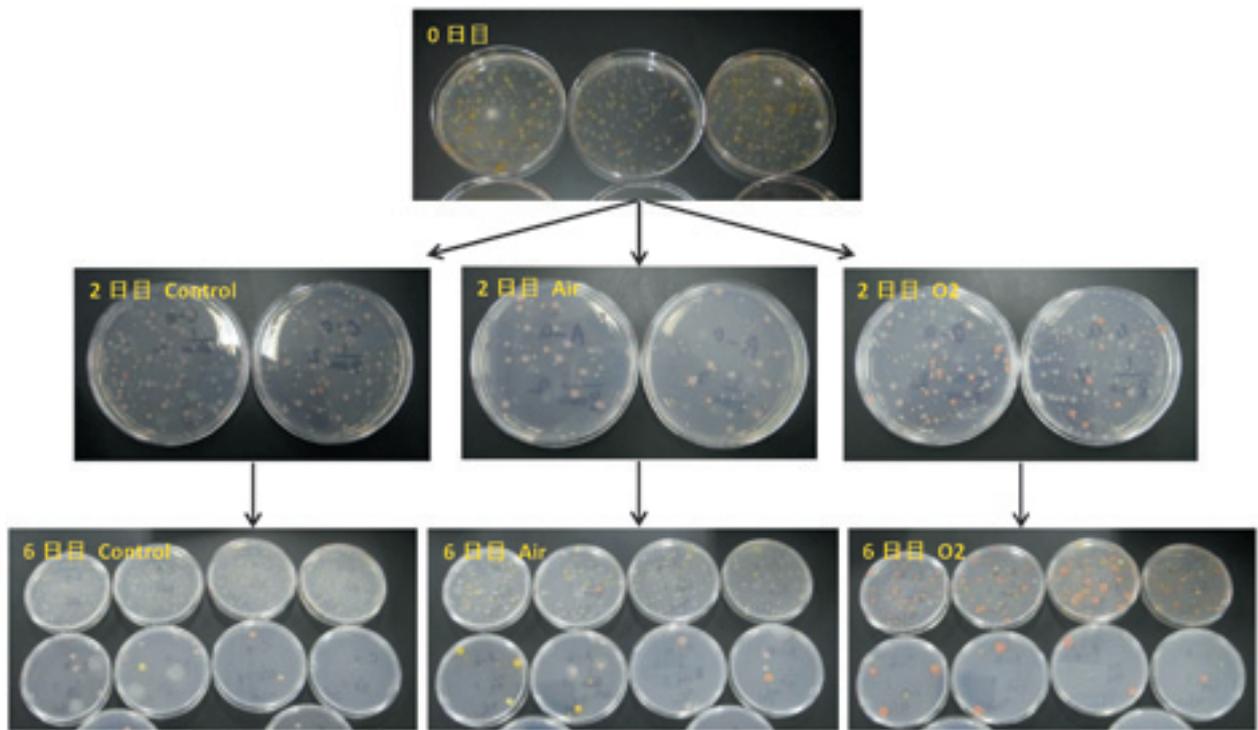


図5. 標準寒天培地上の好気性細菌のコロニー

和環境下であっても差がないことを明らかにした。また、有機物分解に大きく関与すると考えられる微生物群集が空気または酸素の供給によって異なることを示した。水質改善に向けた技術開発へ向けて、本研究のデータが活かされることを期待したい。

#### 謝 辞

本研究は、文部科学省私立大学学術研究高度化推進事業オープンリサーチセンター (ORC) 整備事業 (研究代表者: 高村弘毅)、文部科学省科学研究費基盤 (A) 「高酸素水生成装置を用いる汽水湖貧酸素水塊の水質改善及び湖底の底質改善」 (研究課題番号: 19201016、研究代表者: 清家泰)、文部科学省科学研究費若手研究 (B) 「沿岸域における異化型硝酸還元過程の解明に関する研究」 (研究課題番号: 20710011、研究代表者: 千賀有希子) による研究成果の一部である。

#### 参考文献

- Ashley KI (1988) Hypolimnetic aeration research in British Columbia. *Verh. Internat. Verein. Limnol* 23: 215-219
- Gallizia I, Vezzulli L, Fabiano M (2004) Oxygen supply for biostimulation of enzymatic activity in organic-rich marine ecosystem. *Soil Biol Biochem* 36: 1645-1652
- Gantzer PA, Bryant LD, Little JC (2009) Effect of hypolimnetic oxygenation on oxygen depletion rates in two water-supply reservoirs. *Water Res* 43: 1700-1710
- Holmer M (1999) The effect oxygen depletion on anaerobic organic matter degradation in marine sediments. *Est Coast Shelf Sci* 48, 383-390
- Horne AJ, Goldman CR (1983) *Oxygen and Carbon Dioxide. Limnology*. MacGraw-Hill, Inc., New York, 125-145pp
- Huttunen JT, Hammar T, Alm J, Silvola J, Martikainen PJ (2001) Greenhouse gases in non-oxygenated and artificially oxygenated eutrophied lake during winter stratification *J Environ Qual* 30: 387-394
- Romantschuk M, Sarand I, Petänen T, Peltola R, Jonsson-Vihanne M, Koivula T, Yrjälä K, Haahtela K (2000) Means to improve the effect of in situ bioremediation of contaminated soil: an overview of novel approaches. *Environ Poll* 107; 179-185
- 島谷幸弘 (2003) エコテクノロジーによる水質浄化の概念. 島谷幸弘ほか編 「エコテクノロジーによる河川・湖沼の水質浄化. - 持続的な水環境の保全と再生 -」, ソフトサイエンス社, 1 - 6 pp
- 千賀有希子, 渡辺泰徳 (2008) 汚濁池沼における窒素動態に対する水中への通気の影響 - 水槽実験による解析 - . 立正大学文部科学省学術研究高度化推進事業オープンリサーチセンター (ORC) 整備事業平成19年度事業報告書, 111 - 116pp
- 千賀有希子, 渡辺泰徳 (2009) 汚濁池沼への空気供給が窒素および炭素動態に与える影響. *地球環境研究*, 11, 95 - 102pp
- Tsukada H, Tsujimura S, Nakahara H (2006) Seasonal succession of phytoplankton in Lake Yogo over 2 years: effect of artificial manipulation. *Limnology* 7: 3-14
- Watanabe Y (1975) Effects of partial sterilization on Epibenthic microbial community of river bed. *Jap J Ecol* 25: 53-60
- 渡辺泰徳 (1990) 水界食物連鎖の新しいイメージ. - 見えてきた微小プランクトン - . *遺伝*, 44, 23 - 26pp

## The Effects of Artificial Oxygenation on Mineralization and Microbial Communities in the Polluted Pond Water

SENGA Yukiko\*, WATANABE Yasunori\*

\*Department of Environment Systems, Faculty of Geo-environmental Science, Rissho University

### Abstract:

To elucidate the effects of oxygen supply on mineralization and microbial communities in the organically polluted water, we have studied the change of dissolved organic carbon (DOC) concentration in polluted water incubated under hypersaturation, saturation and subsaturation of dissolved oxygen (DO) conditions; that is, pure oxygen supply, aeration, and without aeration (control). Countings of total bacteria and viable heterotrophic bacteria were also conducted. Incubation was carried out using experimentally polluted pond water under dark condition at 25 °C for 20 days. Decrease of DOC under subsaturation was slow compared to hypersaturation and saturation, while no significance difference was found between hypersaturation and saturation condition. This result suggests that mineralization was not particularly enhanced by saturation. No significant difference in total bacterial counts was found among the three DO conditions. The viable heterotrophic bacterial counts under subsaturation were higher than those under other conditions at the end of experiment. The microscopic appearances of the fluorescence stained bacteria showed that filamentous bacteria was present under all three conditions at 6 days, and then under saturation and subsaturation conditions at 10 days. The bacterial colonies on the agar plates demonstrated that the dominant bacterial groups under hypersaturation were quite different from those under other conditions.

Keywords: Oxygenation, Mineralization, Microbial communities, Polluted pond water