

氏名	加藤 季晋		
学位の種類	博士 (理学)		
学位記番号	総博甲第 1 2 0 号		
学位授与年月日	平成 2 9 年 3 月 2 4 日		
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項		
文部科学省報告番号	甲第 5 9 8 号		
専攻名	総合理工学専攻		
学位論文題目	汽水湖中海におけるアナモックス反応に関する研究 (Study on ANAMOX reaction in brackish Lake Nakaumi)		
論文審査委員	主査	島根大学教授	小俣 光司
		島根大学教授	清家 泰
		島根大学教授	半田 真
		島根大学教授	田中 秀和
		東京大学教授	山室 真澄

論文内容の要旨

中海は外海と狭い水道（境水道）でつながっており、潮汐の影響を受けて物質交換が起こる。また、日本海から塩分を含んだ密度の高い海水が入るため、温度躍層よりも強固な塩分躍層が形成される。中海の湖心では夏季に日本海からの海水の流入による溶存酸素の供給があることと、水深 6 m の底層では光が届くぎりぎりの深度であり、硝化の光阻害が生じ $\text{NO}_2^- \rightarrow \text{NO}_3^-$ のパスが阻害され NO_2^- が蓄積されることが知られている（清家ら, 1997）。

本研究では、新たな窒素循環プロセスであるアナモックス反応に着目した。アナモックス反応はヒドロキシルアミン (NH_2OH) と NH_4^+ が反応して中間体であるヒドラジン (N_2H_4) を形成し、この N_2H_4 から分子状窒素 (N_2) を形成して系外へと放出するものである（Astuid et al. 1997）。この N_2H_4 から N_2 への脱水素反応のとき、 NO_2^- の還元により生成した NH_2OH と NH_4^+ が反応して再び N_2H_4 が形成されることもアナモックス反応の特徴である。中海では、夏季に NO_2^- が蓄積するためアナモックス反応による窒素除去が活発に起きている可能性がある。本研究の第一の目的は、アナモックス反応の中間体である NH_2OH と N_2H_4 の環境水中での挙動からアナモックス反応を確認することにある。そこでまず、中間体という性質上不安定なため、優れた定量方法のなかった NH_2OH 定量法及び N_2H_4 定量法の開発を行った。

既存の NH_2OH の定量法（Seike et al. 2004）は、淡水用であり、中海のような汽水湖には適用できなかった。そこで、本研究では、その妨害物質が海水成分の臭化物イオンであることを見出し、フェノール溶液で臭化物イオンの妨害を除去できることを明らかにした。これによって、汽水や海水に適用できる新規の定量法の開発に成功した。次に N_2H_4 の既存の定量法では、検出下限が $2.0 \mu\text{gN/L}$ と高く、環境水には適用できないことが問題だった。そこで、Sep-Pak C18 カートリッジを用いた、現場固相抽出法に着目した。固相抽出法の利点として、現場で小型カラムに目的物質を補修することで、試料を研究室に持ち帰り測定するまでの間に目的物質の濃度変化を防ぐことができる。現場固相抽出法を用いた N_2H_4 の定量操作によって検出下限を $0.2 \mu\text{gN/L}$ にすることができ、環境水に適用できる定量法の開発に成功した。

新規に開発したこれらの定量法を用いて、汽水湖中海を対象に同時定量を行い、経月変化を観測した。中海湖心の底層（湖底上 0.5 m）の 2014～2015 年の溶存無機態窒素の経月変化から 2014 年夏季（8～9 月）に海水の流入と光阻害による NO_2^- の蓄積が確認された。また、アナモックス反応のもう一つの基質である NH_4^+ や中間体である NH_2OH と N_2H_4 も夏季の NO_2^- の蓄積に伴い増加するのを確認した。このことから中海湖心では、夏季に海水の流入と光阻害による NO_2^- の蓄積を起点にアナモックス反応が生じていることが示唆された。一方、2015 年の NO_2^- の蓄積は 10 月から 11 月にかけて起こり、2014 年よりも遅く観測された。これに伴い、アナモ

ックス反応の中間体である NH_2OH と N_2H_4 も低く検出されたことから、2015 年はアナモックス反応の活性がやや低かったものと考えられた。これより、 NO_2^- の蓄積する時期がアナモックス反応による窒素浄化にとって重要であることがわかった。

さらに、アセチレン阻害法を併用した培養実験によりアナモックス反応による窒素除去量を算出できることを見出し、中海のアナモックス反応による窒素除去率について検討した。その結果、培養開始 3 日目に、アナモックス反応の中間体である NH_2OH と N_2H_4 が増加したことにより、アナモックス反応を確認するとともに、今回の培養実験では、約 6 割がアナモックス反応によって除去されたものと推察された。中海の窒素循環において、これまで一般的な脱窒による窒素除去のみしか考えられていなかったが、本研究により、中海の自然浄化機能としてアナモックス反応が深く関わっていることを明らかにできた。本手法は、今後、世界の多くの研究者によって利用されることが期待される。

論文審査結果の要旨

近年、新たな窒素循環プロセスであるアナモックス反応が発見され注目を集めている。アナモックス反応とは、ヒドロキシルアミン(NH_2OH)と NH_4^+ が反応して中間体であるヒドラジン(N_2H_4)を形成し、この N_2H_4 から分子状窒素(N_2)を形成して系外へと放出する (Astuid et al. 1997) というものであり、窒素浄化に係る新たなプロセスである。加藤氏は、夏季の中海底層で NO_2^- が蓄積されやすいという事象から、アナモックス反応との因果関係に着目して研究を進め、その成果を本学位論文にとりまとめたものである。

本研究では、まず、中間体という性質上不安定なため、優れた定量方法のなかった NH_2OH と N_2H_4 の定量法の開発から着手し、その後、開発した定量法を用いて調査研究を進めている。以下にその概要を示す。

1. 次亜塩素酸を用いたガスクロマトグラフィーによる環境水中の微量ヒドロキシルアミンの定量法の開発
既存の高感度な NH_2OH の定量法 (Seike et al. 2004) は、淡水用であり、中海のような汽水湖には適用できなかった。そこで、汽水や海水試料にも適用できる定量法の開発を目的に検討を進め、その妨害が海水成分の臭化物イオンにあることを見出し、さらに、フェノール溶液でその臭化物イオンの妨害を除去できることを明らかにすることで、汽水や海水に適用できる新規な定量法の開発に成功している。

2. 現場固相抽出による環境水中の微量ヒドラジンの定量法の開発
 N_2H_4 の既存の定量法 (JIS法) では、検出下限が $2.0 \mu\text{gN/L}$ と高く、環境水には適用できないことが問題であった。そこで、Sep-Pak C18カートリッジを用いた、現場固相抽出法に着目し検討を進めた。固相抽出法の利点として、現場で小型カラムに目的物質を捕集することで、試料を研究室に持ち帰り測定するまでの間に目的物質の濃度変化を防ぐことができる。現場固相抽出法を用いた N_2H_4 の定量操作によって検出下限を $0.2 \mu\text{gN/L}$ にすることができ、環境水に適用できる定量法の開発にも成功している。

3. 汽水湖中海における窒素浄化に対するアナモックス反応の寄与
新規に開発したこれらの定量法を用いて、汽水湖中海を対象に NH_2OH と N_2H_4 の同時定量を行い、経月変化を観測した。中海湖心の底層 (湖底上 0.5 m) の2014~2015年の溶存無機態窒素の経月変化から、2014年夏季 (8~9月) に海水の流入と光阻害による NO_2^- の蓄積が確認された。また、アナモックス反応のもう一つの基質である NH_4^+ や中間体である NH_2OH と N_2H_4 も夏季の NO_2^- の蓄積に伴い増加するのを確認した。一方、2015年の NO_2^- の蓄積は10月から11月にかけて起こり、2014年よりも遅く観測された。それに伴い、 NH_2OH と N_2H_4 も低く、2015年はアナモックス反応の活性がやや低い結果を示した。これより、 NO_2^- の蓄積する時期がアナモックス反応による窒素浄化にとって重要であることを示した。これらの結果により、中海では、夏季に海水の流入と光阻害による NO_2^- の蓄積を起点にアナモックス反応が生じていることを明らかにしている。

さらに、アセチレン阻害法を併用した培養実験によりアナモックス反応による窒素除去量を算出できることを見出し、中海のアナモックス反応による窒素除去率について検討した。その結果、培養3日目に、中間体である NH_2OH と N_2H_4 の増加により、アナモックス反応を確認するとともに、今回の培養実験では、約6割がアナモックス反応によって除去されたという結果が得られた。中海の窒素循環において、これまで一般的な脱窒による窒素除去のみしか考えられていなかったが、本研究により、中海の自然浄化機能としてアナモックス反応が深く関わっていることを明らかにしている。

アナモックス反応に関する専門家である外部審査員も本研究の成果、ならびに早期に研究を取りまとめた加藤氏の資質を高く評価した。以上の通り、本論文は、優れた研究成果に基づきまとめられたものであり、本手法は、今後、世界の多くの研究者によって利用されることが期待され、博士（理学）の学位に十分値する内容であると審査委員全員一致で判定した。