

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 ANAMMOX reaction in brackish Lake Nakaumi

加藤 季晋

2016

島根大学大学院総合理工学研究科

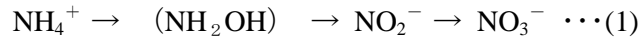
目次

序章	・・・ 2
第1章 次亜塩素酸塩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	・・・ 9
第2章 現場固相抽出による環境水中の微量ヒドラジンの定量	・・・ 25
第3章 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	・・・ 42
第4章 総合考察	・・・ 61
第5章 摘要	・・・ 65
Summary	・・・ 68
引用文献	・・・ 71
論文目録	・・・ 84
謝辞	・・・ 85

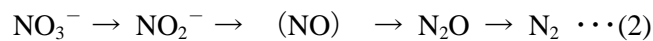
## 序章

天然には、生物に利用される窒素の形態として無機窒素化学種 ( $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{NO}_2^-$ ,  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{N}_2\text{O}$ ,  $\text{NO}$ ,  $\text{N}_2$ )、有機窒素化学種としてアミノ酸、尿素、アミン類などが存在している。窒素は、リンとともに自然環境中の生物のタンパク質や核酸などの構成に利用され、循環している。湖沼では、プランクトンやその他の生物の遺骸、湖沼外から流入した懸濁物に含まれる有機窒素がバクテリアによって分解され、アミノ酸・尿素などの溶存有機窒素を経て  $\text{NH}_4^+$  となる。その後  $\text{NH}_4^+$  がアンモニア酸化細菌、亜硝酸酸化細菌により酸化され  $\text{NO}_3^-$  になる過程を硝化とよぶ。硝化作用（硝化細菌による酸化反応）は、ある程度の溶存酸素がないと進行しないこと、光によって活性を失うことが知られている。 $\text{NO}_3^-$  は、湖沼の溶存酸素がほとんどなくなると、脱窒細菌の働きで還元され亜酸化窒素 ( $\text{N}_2\text{O}$ ) を経て分子状窒素 ( $\text{N}_2$ ) になる。この過程を脱窒とよび、水中の窒素を  $\text{N}_2$  として系外へと放出する過程であるため、富栄養化問題に関連して非常に重要である。このように窒素化合物は、自然環境水中で微生物等により利用され循環しており (Fig. 1)、自然環境・生命現象と深く関わっている。しかし、これらの物質は人間生活により濃度増加をきたし、湖沼における富栄養化の原因として問題となっている。富栄養化は窒素化合物とリン化合物が主な原因である。富栄養化が起こると、植物プランクトンの増殖をきたし、結果として赤潮やアオコの原因となる。植物プランクトンの異常増殖（赤潮やアオコ）は、その分解時に水中溶存酸素を枯渇させ、水中生物の弊死を招くため漁業に悪影響を及ぼす。

硝化を行う硝化細菌は一般に独立栄養細菌または混合栄養細菌 (Laanbroek and Woldendorp, 1995) である。 $\text{NH}_4^+$  を  $\text{NO}_2^-$  に酸化する細菌は主に、*Nitrosomonas* と *Nitrospira* 種で、 $\text{NO}_2^-$  の  $\text{NO}_3^-$  への酸化は主に *Nitrobacter* と *Nitrospira* 種によって行われる (Burrell et al., 1998)。これらの反応は酸素が存在する好氣的条件下で起こり、(1) に示す反応経路を硝化という。



また、脱窒を行う細菌は一般に従属栄養細菌であることが知られ、通性嫌気性細菌や光合成硫黄細菌などが挙げられる。脱窒過程は酸素のない嫌気的条件下で起こり、(2) に示すように、脱窒細菌により  $\text{NO}_3^-$  が  $\text{NO}_2^-$ ,  $\text{NO}$ ,  $\text{N}_2\text{O}$ ,  $\text{N}_2$  へ還元されることにより窒素を系外に除去するプロセスである。そのため、自然の力によって富栄養化抑制を行うプロセスとして重要視されている。



$\text{N}_2\text{O}$  は硝化と脱窒のどちらの過程でも生成し (Fig. 1)、硝化の副産物及び脱窒の中間体として生成する。また、 $\text{N}_2\text{O}$  は  $\text{CO}_2$  の 300 倍の温室効果を持つことが知られているが、 $\text{N}_2\text{O}$  は化学的に安定であるため対流圏では変化せず、成層圏に到達後に一酸化窒素 ( $\text{NO}$ ) となりオゾン層破壊に関わることから問題視されている。このように  $\text{N}_2\text{O}$  は上記のような地球環境に重大な影響を与える物質であるため、京都議定書で削減対象ガスとして指定された。また、 $\text{N}_2\text{O}$  のオゾン層破壊物質としての働きは 2009 年に *Science* で発表された論文 (Ravishankara et al.) によって、世界的に大きな注目を浴び、その重要性が再認識された。

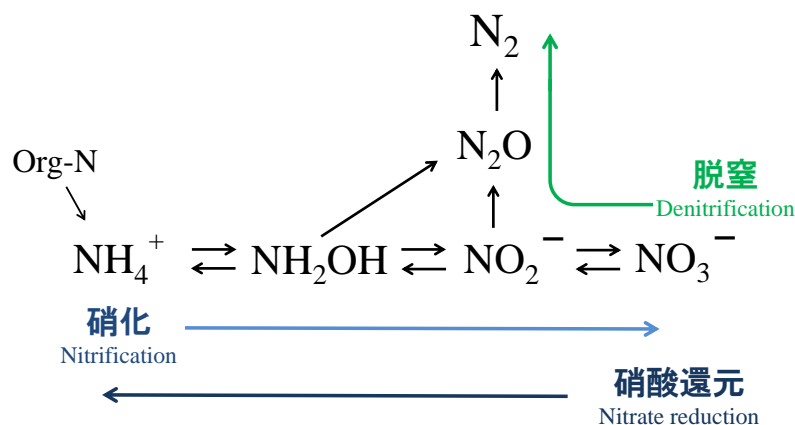


Fig. 1 Microbial nitrogen cycle

近年、新たな窒素除去プロセスであるアナモックス反応（Anammox reaction : anaerobic ammonium oxidation reaction）が提唱された（Mulder et al., 1995）。アナモックス反応は  $\text{NH}_4^+$  を  $\text{NO}_2^-$  により酸化し、 $\text{N}_2$  ガスを生成する反応である（Astrid et al., 1997）。従来の硝化・脱窒に比べて少ないプロセスで窒素を系外へと放出させること、有機炭素源の必要性や曝気によるエネルギー消費が既存のものとは格段に少ない窒素除去系を作れることから、浄化処理施設等で注目されている。このアナモックス反応は熱化学的には可能な反応であるにもかかわらず、このように効率的にエネルギーを得て活動するような微生物が見つかっていなかった。アナモックス細菌が *Planctomycetales* に属する細菌であることが明らかにされ（Koch, 2000）、アナモックス細菌が自然界に広く分布していること（Straus, 1999）、海洋の脱窒にアナモックス細菌が関係していること、その脱窒量は総  $\text{N}_2$  量の 19~35 % を担っている（Dalsgaard, 2003; Marcel, 2003）と Nature 誌に発表され、更に関心が高まっている。また、地球科学的な窒素循環においてもアナモックス反応が重要な意味を持つことも指摘されるようになった（Furukawa, 2004）。

アナモックス反応のプロセスには、中間体として  $\text{N}_2\text{H}_4$  が形成されることが報告されている（Kartal et al., 2016; Oshiki et al., 2016）。この反応機構において、Kartal et al. (2016) は  $\text{NH}_4^+$  と  $\text{NO}$  を利用し、 $\text{N}_2\text{H}_4$  を中間体として形成すると報告している。一方、Astrid et al. (1997) は、 $\text{NH}_4^+$  と  $\text{NO}$  ではなく、 $\text{NH}_4^+$  と  $\text{NH}_2\text{OH}$  から  $\text{N}_2\text{H}_4$  を形成する経路を提示し (Fig.2)、Oshiki et al. (2016) がその経路の存在を実証している。Kobayashi et al. (2019) は、この経路の違いがアナモックス細菌の種の違いによるものであり、アナモックス細菌 "*Ca. Scalindua Japomnica*" や "*Ca. Jettenia caeni*" は  $\text{NO}$  を利用し、"*Ca. Brocadia sinica*" は  $\text{NH}_2\text{OH}$  を利用する、と報告している。何れの反応も、最終的には、 $\text{N}_2\text{H}_4$  が 4 電子を放出し、窒素ガスに変化する。

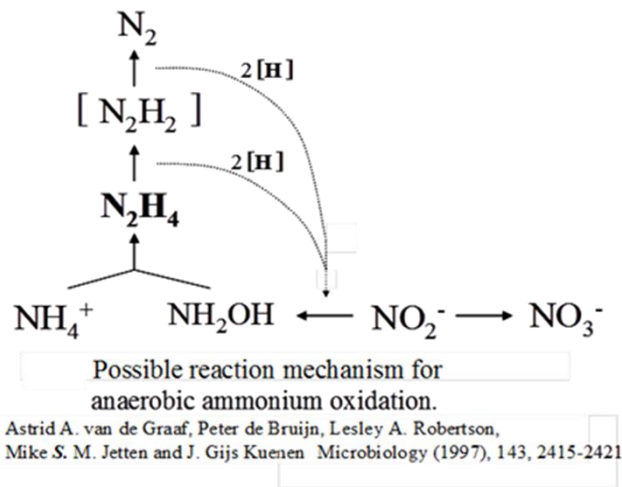


Fig. 2 Anammox reaction

地球全体の窒素循環を考える上でもアナモックス反応は硝化・脱窒と並んで重要な反応であるといえる。また、硝化・脱窒の過程で生成される  $N_2O$  は温暖化ガスの一つであるため水圏の窒素の挙動は地球温暖化に深く関わっている。アナモックス反応はこの  $N_2O$  を生成しないことから重要な窒素除去プロセスであるといえる。そのため、新たに発見されたアナモックス反応を加えて窒素循環モデルを構築する必要がある。2003年に黒海の水塊中にアナモックス細菌が存在し、アナモックス反応によって  $N_2$  ガスを生成していることが証明された (Marcel et al., 2003)。また、世界各地の海水中や堆積物からアナモックス反応や関連細菌に関する報告がなされており、海洋における  $N_2$  ガスの 50 % がアナモックス反応によって生成されているという報告もある (Dalsgaard et al., 2005)。

しかし、水圏におけるアナモックス反応の研究はあまり進んでいない。その一因は、環境水中のアナモックス反応の分析に煩雑で高価な機器を必要とすることにある。アナモックス活性は  $^{15}N$  で標識した  $NH_4^+$  か  $NO_2^-$  のいずれかを試料水に添加して嫌気培養し、アナモックス反応によって生成する  $^{14}N^{15}N$  ガスを定量することで求めることができる。しかし、環境水中の微弱なアナモックス活性を測定するためには、かなり洗練された実験環境と技術を要する。

そこで本研究では、アナモックス反応の中間体として知られている  $\text{NH}_2\text{OH}$  と  $\text{N}_2\text{H}_4$  の定量に着目した。環境水中の  $\text{NH}_2\text{OH}$  と  $\text{N}_2\text{H}_4$  を定量することで、 $^{15}\text{N}$  を用いた同位体測定を使用しなくてもアナモックス反応の有無を確認することができる。また、アナモックス反応の活性の測定にはアセチレン阻害法に注目した (Yoshinari et al., 1977)。アセチレンを試料水に添加することで、脱窒における  $\text{N}_2\text{O}$  から  $\text{N}_2$  への還元を阻害し蓄積する  $\text{N}_2\text{O}$  量を定量することで、脱窒活性 (脱窒速度) を算出することができる。また、 $\text{N}_2\text{O}$  を含めた DIN (溶存無機態窒素) の減少量からアナモックス反応によって除去された窒素除去量を推定できる。

#### 本研究の目的及び本研究の構成

$\text{NH}_2\text{OH}$  の定量法には、分光光度法 (Fiadeiro et al., 1977; Endres and Kaufmann, 1937; Novak and Wilson, 1948; Csaky, 1947) や滴定法 (Rao and Rao, 1957) がある。また、ヨウ素を用いて  $\text{NH}_2\text{OH}$  を  $\text{NO}_2^-$  に酸化し、その  $\text{NO}_2^-$  を比色定量する方法 (福森ら, 2003) も開発されている。しかし、この方法は、検出感度と定量操作の煩雑さに難点がある。そこで、Seike, et al. (2004) は次亜塩素酸ナトリウム ( $\text{NaClO}$ ) を用いて  $\text{NH}_2\text{OH}$  を  $\text{N}_2\text{O}$  に酸化し、ECD つきガスクロマトグラフで測定する定量法を開発した。しかし、この方法は淡水のみに適用可能であり、汽水・海水試料には適用できなかった。そこで、汽水・海水試料の妨害物質の特定と妨害を排除できる方法について検討し、汽水・海水試料にも適用可能な  $\text{NH}_2\text{OH}$  の新規定量法を開発した (第 1 章)。

低濃度のヒドラジンを含む水サンプルの定量としては分光光度法が優れており、代表的な定量法として *p*-ジメチルアミノベンズアルデヒド比色法 (JIS B 8824, 2005) がある。しかし、この定量法はボイラー水に含まれるヒドラジンを測定するものであり、環境水中に微量に存在しているヒドラジンの定量には適していなかった。また、非常に不安定なヒ

ドラジンを安定な状態で現場から持ち帰ることは困難であることもわかった。そこで著者らは、Sep-Pak C18 カートリッジを使用した固相抽出法を用いて、環境水中ヒドラジンの現場での簡単で迅速な濃縮・溶離による新規定量法を開発した（第2章）。

本研究で対象とした中海は、日本海と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。また中海では、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7m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  $\text{NO}_2^-$  が蓄積されることが知られている（清家ら,1997）。したがって中海では、夏季に  $\text{NO}_2^-$  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。そこで、 $\text{NH}_2\text{OH}$  及び  $\text{N}_2\text{H}_4$  の新規定量法を用いて汽水湖中海における  $\text{NH}_2\text{OH}$  及び  $\text{N}_2\text{H}_4$  の同時定量を行い、アナモックス反応の有無を検証した。また、アセチレン阻害法を併用した湖水の嫌気培養によってアナモックス反応と従来の脱窒による窒素除去率を求めた（第3章）。

これらの結果は、Analytical Sciences への投稿及び学会の講演等（汽水域研究会第3回例会 合同研究発表会、第3回若手研究者シーズ発表会、第21回中国四国支部分析若手セミナー、日本陸水学会第80回大会、2015年日本化学会中国四国支部大会、汽水域研究会第4回例会 合同研究発表会、日本陸水学会第81回大会）により公表してきた。本論文は、それらに未発表の成果を加えて取りまとめたものである。



本論文は次の内容で構成されている。

第 1 章 次亜塩素酸塩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

第 2 章 現場固相抽出による環境水中の微量ヒドラジンの定量

第 3 章 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

第 4 章 総合考察

第 5 章 摘要

## 第1章 次亜塩素酸塩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

### はじめに

天然に存在する主な無機窒素化学種には、 $N_2$  の他に  $NH_4^+$ 、 $NO_2^-$ 、 $NO_3^-$  などがある。これらは微生物によって利用され循環する (Seike et al., 1990; Senga et al., 2001; 2002)。これらの窒素化合物は、生命現象と深く関わっているため、環境面において重要視される。例えば、河川・湖沼の富栄養化の主原因は窒素やリンの化合物 (栄養塩) である。窒素やリンは富栄養化によるアオコや赤潮を発生させるため、環境基準が設定されている。

亜酸化窒素 ( $N_2O$ ) は、温暖化ガスとして知られ、京都議定書の削減対象ガスである。その温室効果は、代表的な温室効果ガスの二酸化炭素 ( $CO_2$ ) の約 300 倍である。また、 $N_2O$  は温室効果だけでなくオゾン層破壊物質としての性質を持つ。 $N_2O$  の生成を理解するうえで重要となる物質がヒドロキシルアミン ( $NH_2OH$ ) である。 $NH_2OH$  は硝化と硝酸還元のプロセスで生成する (Hofman and Lees, 1952; Tanaka, 1953)。そのため、地球の大部分を占める水圏での  $NH_2OH$  の生成過程を理解することは  $N_2O$  の生成メカニズムの解明につながる。また、 $NH_2OH$  は近年注目されている嫌氣的アンモニア酸化 (アナモックス) 反応の中間体としても知られている (Astrid et al., 1997, Oshiki et al., 2016)。 $NH_2OH$  を定量することで、アナモックス反応をより詳しく理解できる。

しかし、空気存在下で  $NH_2OH$  の水溶液 (数 mM) は、pH 4 では数日間安定であるものの、pH 7.8 では 60 分程度しか安定でないなど、空気中の酸素によって容易に酸化される (Fiadeiro et al., 1967; Anderson, 1954)。このように  $NH_2OH$  は不安定な物質であり、存在量が微量であるため (Pittwell, 1975)、これまで環境水に適用できる優れた定量法が存在しなかった。

$NH_2OH$  の定量法には、分光光度法 (Fiadeiro et al. 1977; Endres and Kaufmann, 1937; Novak

and Wilson, 1948; Csaky, 1947) や滴定法 (Rao and Rao, 1942) がある。また、ヨウ素を用いて  $\text{NH}_2\text{OH}$  を  $\text{NO}_2^-$  に酸化し、その  $\text{NO}_2^-$  を比色定量する方法 (福森ら, 2003) も開発されている。しかし、これらの方法は検出感度と定量操作の煩雑さに難点があるため、Seike et al. (2004) は次亜塩素酸ナトリウム ( $\text{NaClO}$ ) を用いて  $\text{NH}_2\text{OH}$  を  $\text{N}_2\text{O}$  に酸化し、ECD つきガスクロマトグラフで測定する定量法を開発した。しかし、この方法は淡水のみに適用可能であり、汽水・海水試料には適用できなかった。本研究では、汽水・海水中の妨害物質を特定するとともに、汽水・海水試料に適用可能な定量法を開発した。さらに、本法を島根県東部に位置する汽水湖中海に適用できるか否かを検証した。

## 実験

### 試薬

$\text{NH}_2\text{OH}$  標準溶液 ( $500 \text{ mgN L}^{-1}$ ) は塩酸ヒドロキシルアミン  $0.2481 \text{ g}$  を窒素置換水に溶かし  $100 \text{ mL}$  とした。使用時に適宜希釈して使用した。試薬は実験の都度作り直した。

$\text{NaClO}$  溶液 ( $3.5 \text{ mM}$ ) は次亜塩素酸ナトリウム溶液 (活性塩素  $5 \%$ ) (関東化学、鹿 1 級)  $2.5 \text{ ml}$  をとり、ミリ Q 水を加えて  $50 \text{ ml}$  とした。この  $5 \text{ ml}$  をとりミリ Q 水を加えて  $100 \text{ ml}$  とした。

フェノール溶液 ( $63.6 \text{ mM}$ ) は、フェノール溶液  $10 \text{ g}$  をとり、エタノールを  $10 \text{ ml}$  加えフェノールを溶かした後、ミリ Q 水で  $100 \text{ ml}$  とした。これを  $6 \text{ ml}$  とり、ミリ Q を加えて  $100 \text{ ml}$  とした。

$\text{NH}_4^+$  標準溶液 ( $100 \text{ mgN L}^{-1}$ ) は塩化アンモニウム  $0.3819 \text{ g}$  をミリ Q 水に溶かし  $1 \text{ L}$  とした。使用時に適宜希釈にして用いた。

$\text{NO}_2^-$  標準溶液 ( $100 \text{ mgN L}^{-1}$ ) は亜硝酸ナトリウム  $0.1231 \text{ g}$  をミリ Q 水に溶かし  $250 \text{ mL}$  とした。使用時に適宜希釈して使用した。

$\text{NO}_3^-$ 標準溶液 ( $100 \text{ mgN L}^{-1}$ ) は硝酸カリウム  $0.1805 \text{ g}$  をミリ Q 水に溶かし  $250 \text{ mL}$  とした。使用時に適宜希釈して用いた。

人工海水は Riley and Skirrows (1965) に準じて調製した。NaCl  $23.4 \text{ g}$ ,  $\text{MgCl}_2$   $4.981 \text{ g}$ ,  $\text{Na}_2\text{SO}_4$   $3.917 \text{ g}$ ,  $\text{CaCl}_2$   $1.102 \text{ g}$ , KCl  $0.664 \text{ g}$ ,  $\text{NaHCO}_3$   $0.192 \text{ g}$ , KBr  $0.096 \text{ g}$ ,  $\text{H}_3\text{BO}_3$   $0.026 \text{ g}$ ,  $\text{SrCl}_2$   $0.024 \text{ g}$ , 及び NaF  $0.003 \text{ g}$  をミリ Q 水に溶かし  $1 \text{ L}$  とした。

次亜塩素酸ナトリウム溶液以外の全ての試薬は高純度試薬（和光、特級）を用いた。また、全ての試薬調製には、ミリ Q 水（Millipore）を使用した。

## 装置

電子捕獲検出器 (ECD) 付き Shimadzu GC-14B type ガスクロマトグラフを用いて  $\text{N}_2\text{O}$  を測定した。pH は Horiba F-23 型 pH メーターで測定した。

## ガスクロマトグラフィーの条件

直径  $2.6 \text{ mm}$  の  $2 \text{ m}$  長さのステンレス鋼カラムに Unibeads C (60/80 メッシュ) を充填したものを  $130^\circ\text{C}$  で使用した。注入および検出器 (ECD) の各温度は、それぞれ  $200$  および  $300^\circ\text{C}$  に設定した。キャリアガスとして  $99.99995\%$  等級の窒素 ( $\text{N}_2$ ) を  $50 \text{ mL min}^{-1}$  の速度で使用した。

## 標準定量操作

試料は、 $70 \text{ mL}$  の褐色ガラスバイアル瓶に入れた。バイアル瓶に空気が入らないようにブチルゴムとアルミシールで密封した。次に、 $63.6 \text{ mM}$  のフェノール溶液  $1.0 \text{ mL}$  と  $3.5 \text{ mM}$  の次亜塩素酸溶液  $1.5 \text{ mL}$  を添加し (Fig. 1-1)、 $\text{NH}_2\text{OH}$  を  $\text{N}_2\text{O}$  に酸化させた。あらかじめバイアル瓶の中に入れていたガラスビーズで溶液を混合し、生成した  $\text{N}_2\text{O}$  をヘッドスペース法を用いて定量した。ヘッドスペースは  $99.9\%$  の純窒素をマグナムシリンジを使用して

作成した (Fig. 1-1)。数分間バイアル瓶を振り混ぜた後、気相中の  $\text{N}_2\text{O}$  を ECD つきガスクロマトグラフで測定した。液相中の  $\text{N}_2\text{O}$  濃度は Weiss and Price の式 (1980) から算出した。試料中の  $\text{N}_2\text{O}$  ブランクは、フェノール溶液と次亜塩素酸溶液の添加なしで測定した。 $\text{NH}_2\text{OH}$  はフェノール溶液と次亜塩素酸溶液で生成した  $\text{N}_2\text{O}$  から  $\text{N}_2\text{O}$  ブランクを引くことで求めた。ガスクロマトグラフでの  $\text{N}_2\text{O}$  の定量下限は  $0.2 \mu\text{gN L}^{-1}$  であった。

現地調査では、 $\text{N}_2\text{O}$  分析用のバイアル瓶にホルムアルデヒドを最終濃度 1% になるように注入し、生物活性を停止させた。これを実験室に持ち帰り、ガスクロマトグラフで測定することで、試料水中の  $\text{N}_2\text{O}$  の濃度を得た。 $\text{NH}_2\text{OH}$  分析用のバイアル瓶では、1 mL のフェノール溶液および 1.5 mL の次亜塩素酸塩溶液を添加して  $\text{NH}_2\text{OH}$  を  $\text{N}_2\text{O}$  に酸化した。これを実験室に持ち帰り、ガスクロマトグラフで測定することで、試料水中の  $\text{NH}_2\text{OH}$  の濃度を得た。

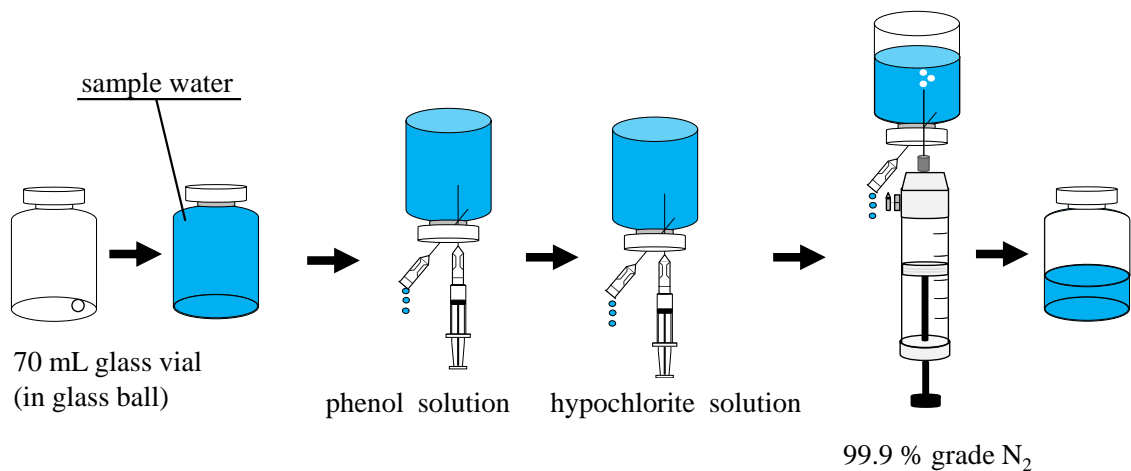
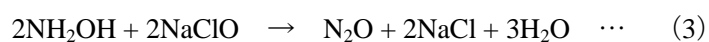


Fig. 1-1 Standard quantitative procedure for hydroxylamine determination.

## 結果と考察

### 汽水・海水試料中の妨害物質

以前の研究で  $\text{NH}_2\text{OH}$  と次亜塩素酸が反応して、定量的に  $\text{N}_2\text{O}$  が生成することを見出している (Seike et al., 2004)。次式 (式 3) の反応に示されるように  $\text{N}_2\text{O}$  が生成する。



しかしながら、この反応は淡水試料に対しては定量的に起こるが、汽水・海水試料に対しては妨害を受ける難点があった。そこで、この方法の  $\text{N}_2\text{O}$  生成に及ぼす塩分の影響を検討した。人工海水 (0~35 %) を用いて  $\text{NH}_2\text{OH}$  標準溶液 ( $50 \mu\text{gN L}^{-1}$ ) を調製した。これに、 $\text{NaClO}$  溶液を  $75 \mu\text{M}$  となるように添加した後、 $\text{N}_2\text{O}$  を ECD つきガスクロマトグラフを用いて測定した。その結果、塩分の増加に伴い  $\text{NH}_2\text{OH}$  から  $\text{N}_2\text{O}$  への回収率は低下した (Fig. 1-2)。次に、 $\text{NH}_4^+$  ( $1 \text{ mgN L}^{-1}$ ) 共存下での塩分の影響を検討した。 $\text{NH}_4^+$  ( $1 \text{ mgN L}^{-1}$ ) の添加以外は、前述と同条件で検討を行った。 $\text{NH}_4^+$  共存下では、 $\text{N}_2\text{O}$  としての回収率は 0~17 % までは塩分の増加に伴い増加し、その後 17~35 % にかけて減少した (Fig. 1-3)。

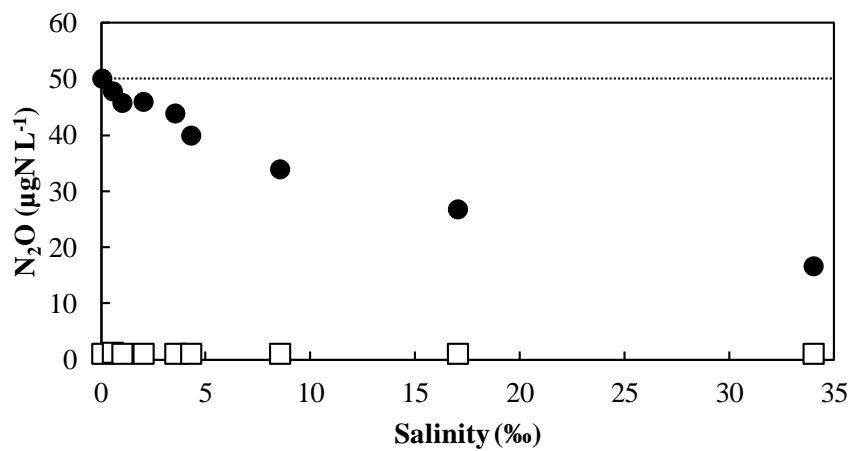


Fig. 1-2 Effect of salinity (artificial seawater) on the oxidation of NH<sub>2</sub>OH to N<sub>2</sub>O using NaClO in the absence of NH<sub>4</sub><sup>+</sup>. NH<sub>2</sub>OH: ●, 50 µgN L<sup>-1</sup>; □, 0 µgN L<sup>-1</sup>.

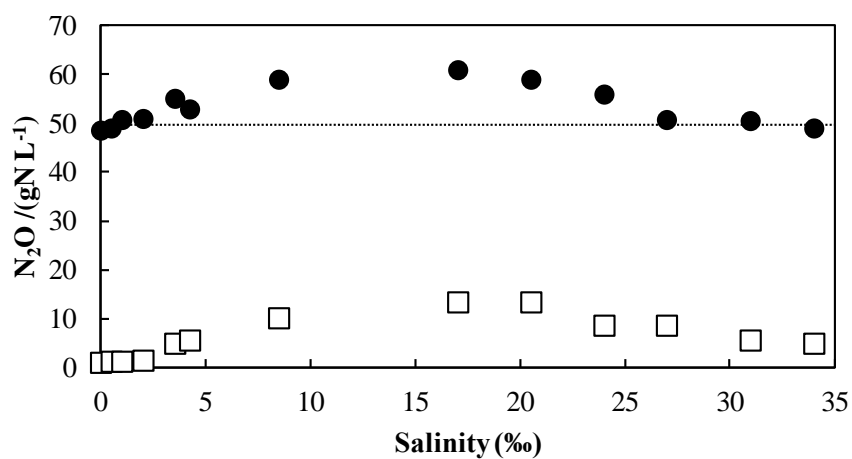
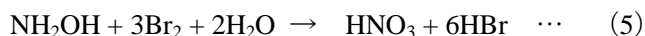
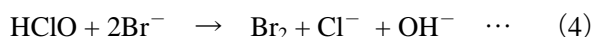


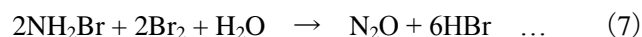
Fig. 1-3 Effect of salinity (artificial seawater) on the oxidation of NH<sub>2</sub>OH to N<sub>2</sub>O using NaClO in the presence of NH<sub>4</sub><sup>+</sup> (1 mgN L<sup>-1</sup>). NH<sub>2</sub>OH: ●, 50 µgN L<sup>-1</sup>; □, 0 µgN L<sup>-1</sup>.

次に汽水・海水試料中の妨害物質を調べるために、人工海水の成分ごとに検討を行った。各成分濃度が塩分 17 %のときの濃度になるように調製し、かつ pH を海水程度にするため炭酸水素ナトリウム (NaHCO<sub>3</sub>) を各サンプルに加えた。これに 50 μgN L<sup>-1</sup> となるように NH<sub>2</sub>OH 標準溶液を添加した。各成分以外は、前述と同条件で検討を行った。その結果、KBr サンプルのみ N<sub>2</sub>O としての回収率の著しい低下が見られた (Fig. 1-4)。次に、NH<sub>4</sub><sup>+</sup> (1 mgN L<sup>-1</sup>) 共存下で同様の実験を行った。NH<sub>4</sub><sup>+</sup> 共存下では、KBr のみ回収率が増加した (Fig. 1-5)。

これらの結果から、従来法 (Seike et al., 2004) の妨害成分は汽水・海水試料に含まれる Br<sup>-</sup> であることがわかった。Br<sup>-</sup> と次亜塩素酸が反応し Br<sub>2</sub> が生成される (式 4)。次に、Br<sub>2</sub> と NH<sub>2</sub>OH が反応し HNO<sub>3</sub> となる (式 5)。この反応メカニズムにより従来法の定量に妨害を生じたと考えられた。



一方、NH<sub>3</sub> の存在下では、NH<sub>3</sub> が Br<sub>2</sub> と反応して NH<sub>2</sub>Br (式 6) を形成し、次いでその NH<sub>2</sub>Br が Br<sub>2</sub> と反応して N<sub>2</sub>O (式 7) を形成することが示唆された。また Br<sub>2</sub> が高濃度の場合、Br<sub>2</sub> は NHBr<sub>2</sub> と反応して NHBr<sub>2</sub> (式 8) を生成し、NHBr<sub>2</sub> は NH<sub>2</sub>Br と反応して N<sub>2</sub> を生成する (式 9)。Br<sub>2</sub> の存在量 (Br を含む) は塩分の増加とともに増加するため、これらの反応式から Fig. 1-3 に示す結果を説明することができる。





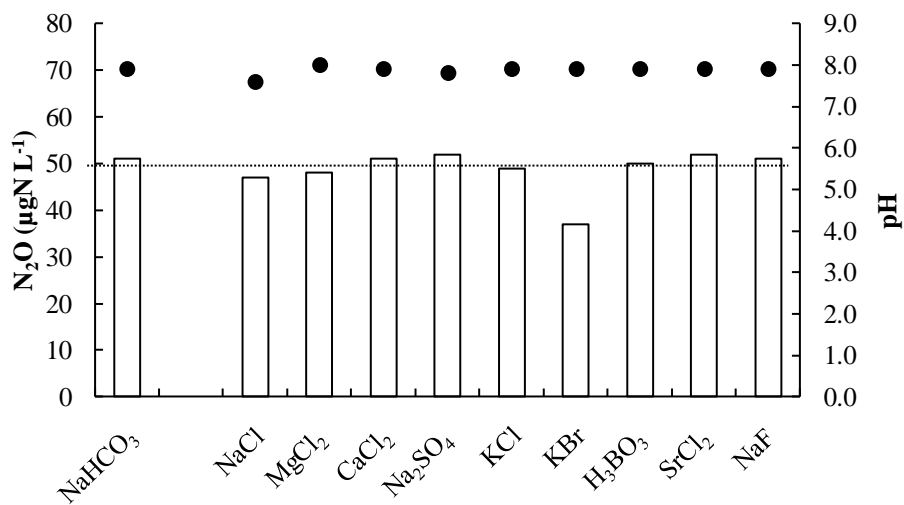


Fig. 1-4 Effect of individual seawater components (at 17‰ salinity) on the oxidation of NH<sub>2</sub>OH to N<sub>2</sub>O using NaClO. All samples contain NaHCO<sub>3</sub> for pH adjustment. NH<sub>2</sub>OH concentration: 50 µgN L<sup>-1</sup>. ●, pH; □, N<sub>2</sub>O.

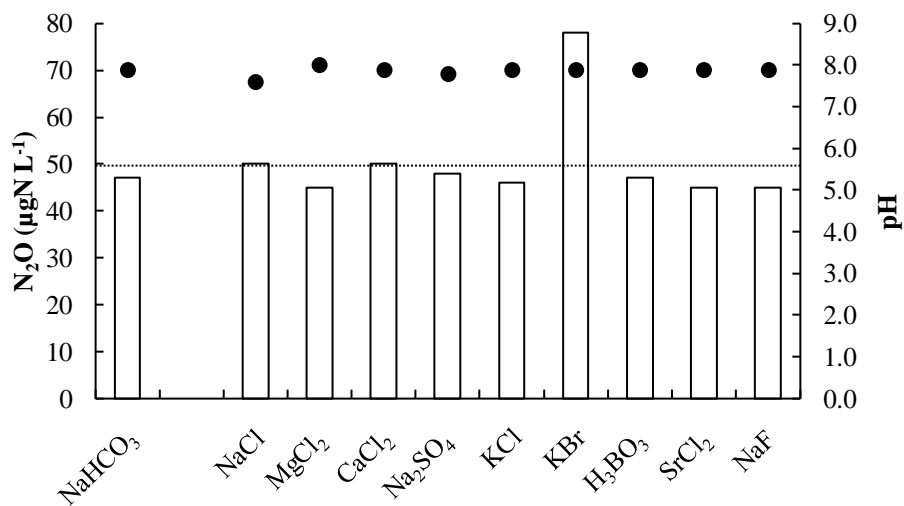


Fig. 1-5 Effect of individual seawater components (at 17‰ salinity) on the oxidation of NH<sub>2</sub>OH to N<sub>2</sub>O using NaClO when NH<sub>4</sub><sup>+</sup> (1 mgN L<sup>-1</sup>) is present. All samples contain NaHCO<sub>3</sub> for pH adjustment. NH<sub>2</sub>OH concentration: 50 µgN L<sup>-1</sup>. ●, pH; □, N<sub>2</sub>O.

### 妨害物質 (Br<sub>2</sub>) の除去

Fig.1-6 に示されるように、フェノールの-Hが Br<sub>2</sub>によって定量的に置換され、トリブロモフェノールを生成する。そこで、フェノール溶液を用いた妨害物質 (Br<sub>2</sub>) の除去法を検討した。0.82 mM の Br<sup>-</sup> (海水相当) 存在下で、フェノール溶液 (0.1~1.5 mM) を添加し、NH<sub>2</sub>OH から N<sub>2</sub>O への回収率をみた。その結果、0.45 mM 以上のフェノールでその妨害を除去できることがわかった (Fig. 1-7)。本法では、安全をみて 0.90 mM のフェノール濃度に調製することとした。

次に、次亜塩素酸ナトリウム濃度が 19~94 μM になるように添加し、NH<sub>2</sub>OH から N<sub>2</sub>O への回収率をみた。その結果、47~94 μM の濃度で高い N<sub>2</sub>O の回収率を得た (Fig. 1-8)。本法では、75 μM の次亜塩素酸ナトリウム濃度に調製することとした。

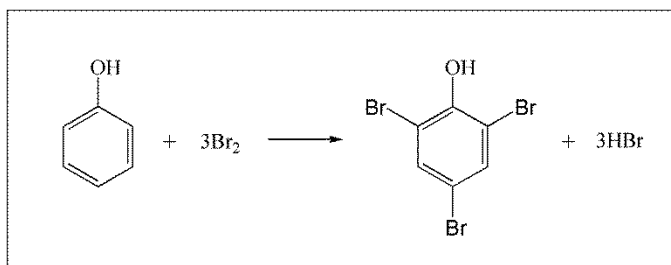


Fig. 1-6 Formula for reaction of phenol with Br<sub>2</sub>.

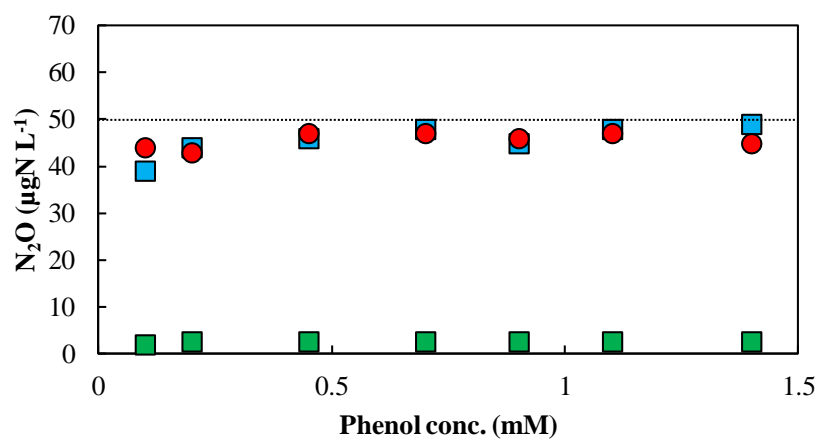


Fig. 1-7 Effect of phenol concentration on the oxidation of  $\text{NH}_2\text{OH}$  to  $\text{N}_2\text{O}$  using  $\text{NaClO}$  in the presence of  $0.82 \text{ mM Br}^-$ . ●,  $\text{NH}_2\text{OH}$  ( $50 \mu\text{gN L}^{-1}$ ) and  $\text{NH}_4^+$  ( $0 \text{ mgN L}^{-1}$ ); ■,  $\text{NH}_2\text{OH}$  ( $50 \mu\text{gN L}^{-1}$ ) and  $\text{NH}_4^+$  ( $1 \text{ mgN L}^{-1}$ ); ■,  $\text{NH}_2\text{OH}$  ( $0 \mu\text{gN L}^{-1}$ ) and  $\text{NH}_4^+$  ( $1 \text{ mgN L}^{-1}$ ).

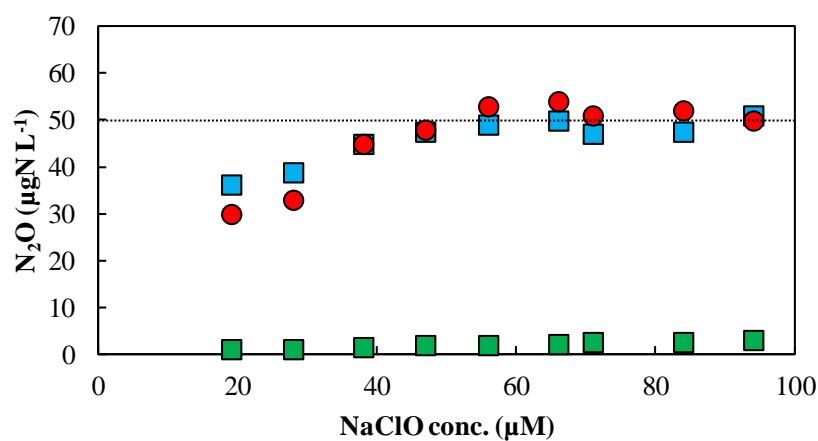


Fig. 1-8 Effect of the  $\text{NaClO}$  concentration on the oxidation from  $\text{NH}_2\text{OH}$  to  $\text{N}_2\text{O}$  in the presence of  $0.82 \text{ mM Br}^-$ . ●,  $\text{NH}_2\text{OH}$  ( $50 \mu\text{gN L}^{-1}$ ) and  $\text{NH}_4^+$  (no addition); ■  $\text{NH}_2\text{OH}$  ( $50 \mu\text{gN L}^{-1}$ ) and  $\text{NH}_4^+$  ( $1 \text{ mgN L}^{-1}$ ); ■,  $\text{NH}_2\text{OH}$  (no addition) and  $\text{NH}_4^+$  ( $1 \text{ mgN L}^{-1}$ ).

## pH の影響

$\text{NH}_2\text{OH}$  から  $\text{N}_2\text{O}$  への酸化に及ぼす pH の影響を調べた。人工海水（炭酸水素ナトリウムを除く）を用い、希水酸化ナトリウム及び希硫酸を添加して pH を 4～10 に調製した。Fig. 1-9 に示す通り、pH6 から 8.5 の範囲で  $\text{NH}_2\text{OH}$  から生成した  $\text{N}_2\text{O}$  を定量的に回収できた。

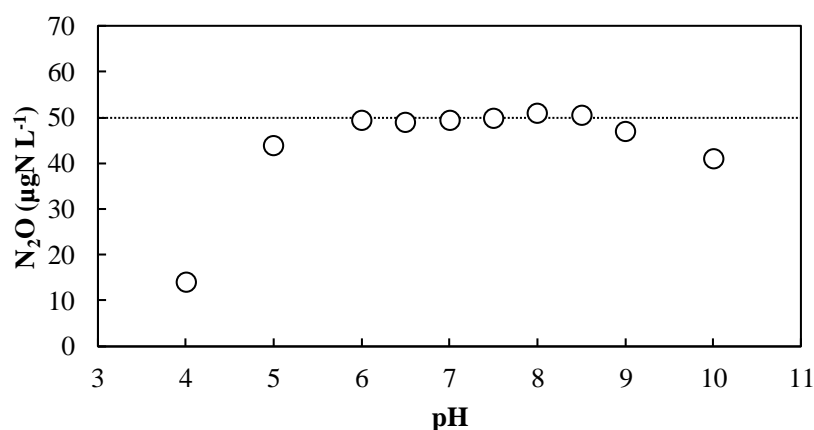


Fig. 1-9 Effect of pH on the oxidation of  $\text{NH}_2\text{OH}$  to  $\text{N}_2\text{O}$  using  $\text{NaClO}$ .

## その他の物質の影響

環境水中の窒素化学種には、 $\text{NH}_2\text{OH}$  のほかに  $\text{NH}_4^+$ 、 $\text{NO}_2^-$ 、 $\text{NO}_3^-$  が存在している。そこで、本法における窒素化学種の影響を調べた。 $\text{NH}_4^+$  と  $\text{NO}_3^-$  は 0 から  $2000 \mu\text{gN L}^{-1}$  の範囲で妨害は見られず、 $\text{NH}_2\text{OH}$  から生成した  $\text{N}_2\text{O}$  を定量的に回収できた。 $\text{NO}_2^-$  による妨害は 0 から  $300 \mu\text{gN L}^{-1}$  の範囲では認められず定量的に回収できたが、 $500 \mu\text{gN L}^{-1}$  以上では回収率が減少した (Fig. 1-10)。しかし、一般的な環境水中において  $\text{NO}_2^-$  は低濃度であり、島根県東部に位置する汽水湖中海においても  $300 \mu\text{gN L}^{-1}$  を上回ることはほとんどないため、支障はないものと考えられる。

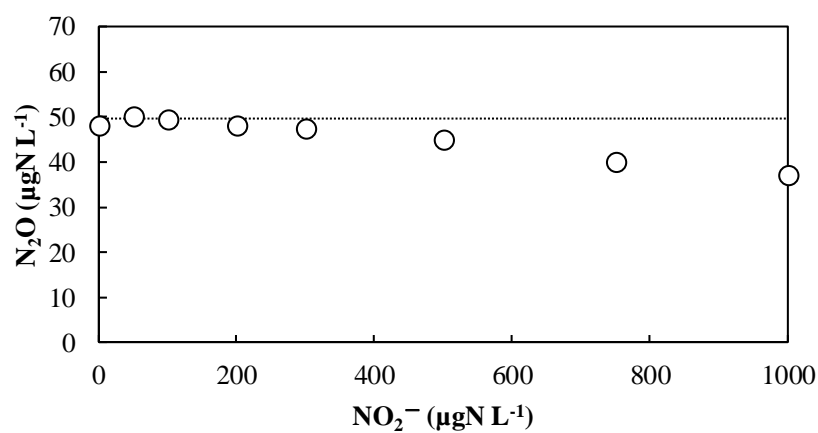


Fig. 1-10 Effect of NO<sub>2</sub><sup>-</sup> concentration on the oxidation of NH<sub>2</sub>OH to N<sub>2</sub>O using NaClO.

夏季において、嫌気的な環境となるような汽水域の底層では H<sub>2</sub>S の発生が見られる。そこで、H<sub>2</sub>S の影響について検討した (Fig. 1-11)。その結果、H<sub>2</sub>S 濃度の増加に伴い NH<sub>2</sub>OH の N<sub>2</sub>O としての回収率が低下し、5 mgS L<sup>-1</sup> 以上では回収率はほぼ 0% となった。この原因としては、酸化剤の NaClO が H<sub>2</sub>S の酸化に使われたためと考えられる。

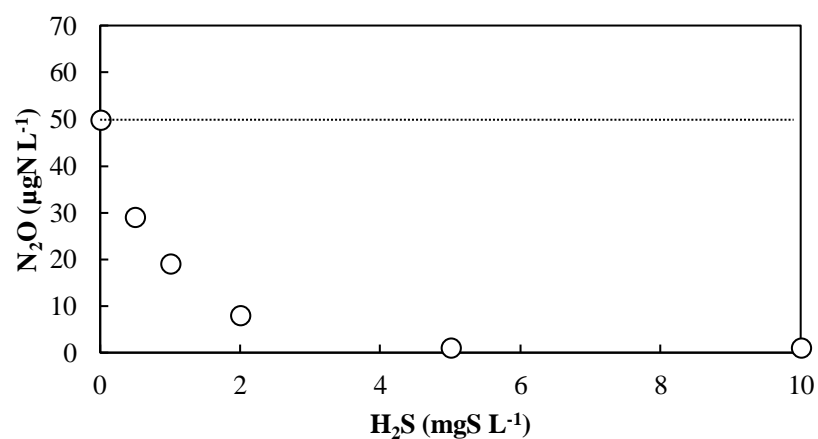


Fig. 1-11 Effect of H<sub>2</sub>S concentration on the oxidation of NH<sub>2</sub>OH to N<sub>2</sub>O using NaClO.

## 塩分の影響

本法の定量操作によって、海水中の  $\text{Br}^-$  の妨害を除去できることがわかったので、実際に人工海水を用いて塩分の影響がないかどうかを検証した。人工海水 (0~35‰) を用いて  $\text{NH}_2\text{OH}$  標準溶液 ( $50 \mu\text{gN L}^{-1}$ ) を調製した。これに、 $0.90 \text{ mM}$  のフェノール溶液と  $75 \mu\text{M}$   $\text{NaClO}$  溶液となるように添加した。その後、 $\text{N}_2\text{O}$  を ECD つきガスクロマトグラフを用いて定量した。また、 $\text{NH}_4^+$  ( $1 \text{ mgN L}^{-1}$ ) 共存下で同様の操作を行い、塩分の影響を検討した。その結果、 $\text{NH}_4^+$  の存在の有無にかかわらず、淡水 (0 ‰) から海水 (35 ‰) の範囲に至るまで、塩分の影響を防ぐことができた (Fig. 1-12)。

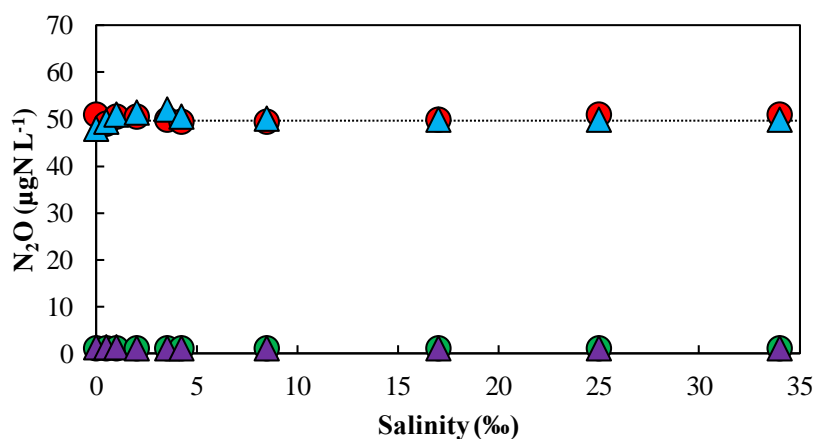


Fig. 1-12 Effect of salinity (artificial seawater) on the oxidation of  $\text{NH}_2\text{OH}$  to  $\text{N}_2\text{O}$  using  $\text{NaClO}$ . ●,  $\text{NH}_2\text{OH}$  ( $50 \mu\text{gN L}^{-1}$ ) and  $\text{NH}_4^+$  ( $0 \text{ mgN L}^{-1}$ ); ▲,  $\text{NH}_2\text{OH}$  ( $50 \mu\text{gN L}^{-1}$ ) and  $\text{NH}_4^+$  ( $1 \text{ mgN L}^{-1}$ ); ●,  $\text{NH}_2\text{OH}$  ( $0 \mu\text{gN L}^{-1}$ ) and  $\text{NH}_4^+$  ( $0 \text{ mgN L}^{-1}$ ); ▲,  $\text{NH}_2\text{OH}$  ( $0 \mu\text{gN L}^{-1}$ ) and  $\text{NH}_4^+$  ( $1 \text{ mgN L}^{-1}$ ).

## 添加回収実験

本法による  $\text{NH}_2\text{OH}$  から  $\text{N}_2\text{O}$  への回収率を、汽水サンプル (2.2~26.0 ‰) に  $\text{NH}_2\text{OH}$  (20 と  $50 \mu\text{gN L}^{-1}$ ) を添加することで調べた。Table 1-1 に示すように、1.6~3.8 %の標準偏差 (RSD) で  $\text{NH}_2\text{OH}$  を試料溶液から定量的に回収した。  $\text{NH}_2\text{OH}$  の回収率は 101~105 %の範囲であった。

Table 1-1 Recovery of  $\text{NH}_2\text{OH}$  as  $\text{N}_2\text{O}$  in brackish water samples

Sample	Added	Found	Recovery		RSD (n=5)
	$\mu\text{gN L}^{-1}$	$\mu\text{gN L}^{-1}$	$\mu\text{gN L}^{-1}$	%	%
Asakumi river 2.2 psu	0	7.3	—	—	—
	20	27.6	20.3	102	1.7
	50	58.6	51.3	103	2.0
Ohashi river 11.5 psu	0	0.6	—	—	—
	20	21.5	20.9	105	3.8
	50	51.8	51.2	102	2.0
Lake Nakaumi 26.0 psu	0	0.4	—	—	—
	20	20.5	20.1	101	3.5
	50	50.7	50.3	101	1.6

## 環境水への適用

本法を 2014 年 8 月 21 日に採取した汽水湖沼の中海の水試料に適用した。北原式採水器を用いて採水したサンプルを、褐色バイアル瓶 (70 mL) に注入し密閉した。その後  $\text{NH}_2\text{OH}$  定量用サンプルには、フェノール溶液 (63.6 mM) 1 mL と  $\text{NaClO}$  溶液 (3.5 mM) 1.5 mL を添加した。  $\text{N}_2\text{O}$  定量用サンプルには生物活性を停止するためにホルムアルデヒドを 1% となるように添加した。これらの操作を現場で行い、実験室に持ち帰った。ヘッドスペース法を用いて生成した  $\text{N}_2\text{O}$  を ECD つきガスクロマトグラフで定量した。さらに、アンモニア、亜硝酸、および硝酸の測定のための水サンプルをポリエチレンボトルに採取しその後、実験室に持ち帰り分析した。

$\text{NH}_2\text{OH}$ 、 $\text{N}_2\text{O}$ 、 $\text{NH}_4^+$ 、 $\text{NO}_2^-$ 、及び $\text{NO}_3^-$ の鉛直分布を Fig. 1-13 に示す。 $\text{NH}_2\text{OH}$  の濃度は深度 5 m で増加し始め、深度 6 m で  $1.6 \mu\text{gN L}^{-1}$  という高い値に達した。 $\text{N}_2\text{O}$  の濃度は深度 4 m で増加し始め、深度 6.5 m で  $1.0 \mu\text{gN L}^{-1}$  という高い値を観測した。 $\text{NH}_4^+$  と  $\text{NO}_2^-$  も深度が深くなるにつれてより高くなる傾向を示した。 $\text{NH}_4^+$  は湖底の堆積物から溶出し、一方、 $\text{NO}_2^-$  は、日本海からの海水の流入時に供給される酸素を利用するアンモニア酸化細菌により生成され、亜硝酸酸化細菌が光阻害を受けて  $\text{NO}_2^-$  が硝化しないことによって蓄積することが報告されている (清家ら, 1997)。中海湖心の底層では  $\text{NO}_2^-$  の生成が、 $\text{N}_2\text{O}$  と  $\text{NH}_2\text{OH}$  の生成に大きく関わっていることが示唆された。

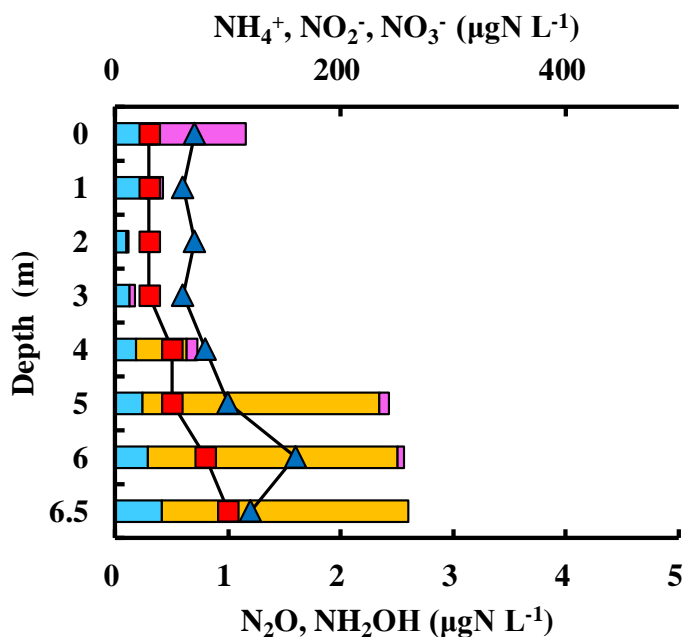


Fig. 12 Vertical distribution of nitrogenous species at the center of Lake Nakaumi (August 21, 2014) .  $\blacktriangle$  ,  $\text{NH}_2\text{OH}$ ;  $\blacksquare$  ,  $\text{N}_2\text{O}$ ;  $\blacksquare$  ,  $\text{NH}_4^+$ ;  $\blacksquare$  ,  $\text{NO}_2^-$ ;  $\blacksquare$  ,  $\text{NO}_3^-$ .



## 結論

前報の次亜塩素酸を用いた  $\text{NH}_2\text{OH}$  の定量法 (Seike et al., 2004) に対する汽水・海水試料の妨害物質が  $\text{Br}^-$  であることを見出した。次亜塩素酸を添加する前にフェノール溶液を添加することによってその妨害を排除できることを明らかにし、汽水・海水試料にも適用可能な  $\text{NH}_2\text{OH}$  の新規定量法を開発した。本法は、定量下限が  $0.2 \mu\text{gN L}^{-1}$  であり、淡水から海水まで広い塩分範囲のサンプルに適用できる。本法を汽水湖沼の中海に適用したところ、中海湖心の底層には、高濃度の  $\text{NH}_2\text{OH}$ 、 $\text{N}_2\text{O}$ 、 $\text{NH}_4^+$ 、 $\text{NO}_2^-$  が観測され、特に  $\text{NO}_2^-$  の生成が、 $\text{N}_2\text{O}$  と  $\text{NH}_2\text{OH}$  の生成に大きく関わっていることが示唆された。

## 第2章 現場固相抽出による環境水中の微量ヒドラジンの定量

### はじめに

ヒドラジン ( $\text{N}_2\text{H}_4$ ) は、比較的強い反応性を示し、分析 (Seike et al., 2000) や金属皮膜、写真薬剤、抗酸化物質、殺虫剤、プラスチックのための材料など様々な分野に用いられている物質である。

近年、このヒドラジンが嫌氣的アンモニア酸化 (Anammox : anaerobic ammonium oxidation) 型脱窒反応の中間体として生成するといわれている (Astrid et al., 1997, Oshiki et al., 2016, Kartal et al. 2016)。アナモックス反応はその関心度の高さの反面、菌の培養条件や反応機構など、未解明な部分が多い。そこでヒドラジンを定量することでアナモックス反応の解明につながるのではないかと考え、ヒドラジンの定量を試みた。

ヒドラジンの定量法には、ボルタンメントリー (Wang 1988)、電量分析 (Fogg et al., 1984)、ガスクロマトグラフィー (Liu et al., 1974)、蛍光分光分析 (Roth et al., 1962)、分光光度法 (Amlathe et al., 1990; Kaveeshwa et al., 1992)、滴定法 (Verma et al., 1979)、などがある。低濃度のヒドラジンを含む水サンプルの定量としては分光光度法が優れており、代表的な定量法として *p*-ジメチルアミノベンズアルデヒド比色法 (JIS B 8824, 2005) が存在する。しかし、この定量法はボイラー水に含まれるヒドラジンを測定するものであり、環境水中に微量に存在しているヒドラジンの定量には適していなかった。また、非常に不安定なヒドラジンを安定な状態で現場から持ち帰ることは困難であった。

そこで、濃縮操作と安定性の両方を可能にするため、Sep-Pak C18 カートリッジを用いた現場固相抽出法 (奥村ら, 2005) に着目した。この現場固相抽出法は多くの利点を持つ濃縮法である。固相抽出法の利点として、溶媒抽出とは違い有害な有機溶媒を多量に使用することがないため環境負荷が小さく、長時間にわたる攪拌なども必要でないため現場での補

修操作が簡単で迅速である。また、現場で小型カラムに目的物質を補修し栓をすることで小型カラムを密閉系にすることができるため、試料を研究室に持ち帰り測定を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。他にも多量の試料水を持ち帰る必要がないなど多くの利点がある。これまで、現場固相抽出技術 (Okumura et al., 1999; 2002; 1997; 2005) を用いて、環境水試料中の溶存硫化物、マンガン、鉄 (II)、アンモニア態窒素の定量法が開発されている。

この現場固相抽出法を行うため固相吸着材に Sep-Pak C18 カートリッジ (オクタデシル基結合型シリカゲル充填) を用いた。C18 による吸着は疎水性相互作用によるものである。本来、環境水中のヒドラジンはイオン状態で吸着することはないが *p*-ジメチルアミノベンズアルデヒド (*p*-DMAB) と反応させることにより (Fig. 2-1) 無極性の分子のアルダジンとなり C18 に対する親和性が高くなり吸着させることが可能となる。

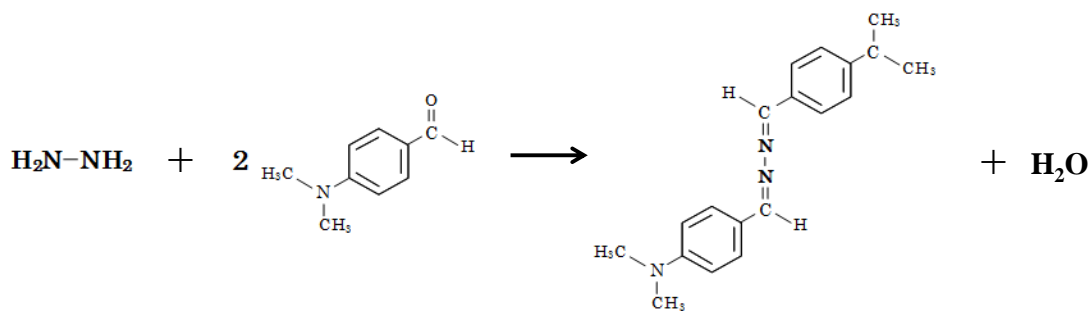


Fig. 2-1 Chemical reaction from hydrazine and *p*- dimethylaminobenzaldehyde (*p*-DMAB) to aldazine.

本研究では、環境水中ヒドラジンの現場での簡単で迅速な濃縮方法を開発した。この方法は、ヒドラジンと *p*-DMAB (Fig. 2-1) を反応させて形成されたアルダジンを Sep-Pak C18 カートリッジに充填された C18 結合シリカと固相抽出を行い、続いて分光光度法を用いてヒドラジンの定量を行う。この方法を、島根県東部に位置する汽水湖中海に適用した。

## 実験

### 試薬及び装置

ヒドラジニウムイオン標準溶液 ( $100 \text{ mgN L}^{-1}$ ) : 塩化ヒドラジウム  $0.318 \text{ g}$  を  $12 \text{ M}$  塩酸  $10 \text{ mL}$  と水  $20 \text{ mL}$  を混ぜた溶液中に溶かし、水で  $1000 \text{ mL}$  とした。これを原液として、希塩酸 (1:99) で適宜希釈して用いた。この標準溶液は、月に一度作り替えた。

*p*-ジメチルアミノベンズアルデヒド溶液: *p*-ジメチルアミノベンズアルデヒド  $2.0 \text{ g}$  をメタノール  $200 \text{ mL}$  と  $12 \text{ M}$  塩酸  $20 \text{ mL}$  とを混ぜた溶液中に溶かし、着色ガラス瓶に保存した。この発色試薬は使用の度に適宜調整した。

希塩酸 (1:99) :  $6 \text{ M}$  塩酸  $20 \text{ mL}$  を全量フラスコ  $1000 \text{ mL}$  に移し入れ、水で  $1000 \text{ mL}$  とした。

塩酸・エタノール (1:10) 混合溶液:  $12 \text{ M}$  塩酸  $10 \text{ mL}$  とエタノール  $100 \text{ mL}$  を混合したものを用いた。この混合溶液は使用の度に適宜調整した。

尿素標準溶液 ( $100 \text{ mgN L}^{-1}$ ) : 尿素 ( $0.858 \text{ g}$ ) を水に溶かし  $1000 \text{ mL}$  とした。

硫化水素標準溶液 ( $100 \text{ mgS L}^{-1}$ ) : 硫化ナトリウム ( $0.76 \text{ g}$ ) を水に溶解し、さらに希塩酸で中和した後、水で  $1000 \text{ mL}$  とした。硫化水素標準溶液は使用の度に適宜調整した。

全て高純度試薬 (特級、Wako 社製) を使用した。また、全ての分析手順において、Milli-Q 水 (Millipore Co.) を使用した。

定量送液ポンプは、東京理化学工業製カセットチューブポンプ SMP-23 型 EYELA を用いた。小型カラムは、Waters 社製の Sep-Pak C18 カートリッジ（オクタデシル基結合型シリカゲル充填）を使用した。吸光度は Shimadzu 製の Shimadzu UV-1800-type 吸光光度計を用いて測定した。

### 標準定量操作

Sep-Pak C18 は、捕集操作を行う直前にコンディショニングを行った。コンディショニングには Sep-Pak C18 にエタノール 8 mL、50%エタノール 5 mL、水 10mL を順次通し行った。その際の流速は  $5 \text{ mL min}^{-1}$  で行った。コンディショニングした Sep-Pak C18 は乾燥を防ぐためにシリコン栓及びゴム栓で密閉して保存した。

ヒドラジン含有水 50 mL を 50 mL 用シリンジに採取した。これを、 $0.2 \mu\text{m}$  のコマ型ろ紙（ADVANTEC 社製、直径 25 mm）とコンディショニングした Sep-Pak C18 を用いてろ過を行った。そして、シリンジ内に 10 mL プラスチックシリンジを用いて発色試薬の *p*-DMAB 溶液 6 mL を三方活性（テルモ社製）を介して添加した後、10 分間放置した。放置後、試料溶液 50 mL を Sep-Pak に通した。なお、試料溶液をカラムに通す際の通水速度は  $8 \text{ mL min}^{-1}$  で行った。現場では計時しながら、手動で流速を調整した。そして、シリコン栓及びゴム栓で密閉し実験室に持ち帰った。次に溶離液として塩酸・エタノール（1:10）混合溶液 8 mL を、溶離を容易にするために吸着操作とは逆方向から Sep-Pak に通水速度  $10 \text{ mL min}^{-1}$  で通して溶離させた。溶離後すぐに溶離液の 457 nm の吸光度を吸光光度計で測定し、検量線によりヒドラジンの濃度を定量した（Fig. 2-2）。

カラムに溶液を通す際の通水速度は、実験室においてはカセットチューブポンプの使用により調整した。

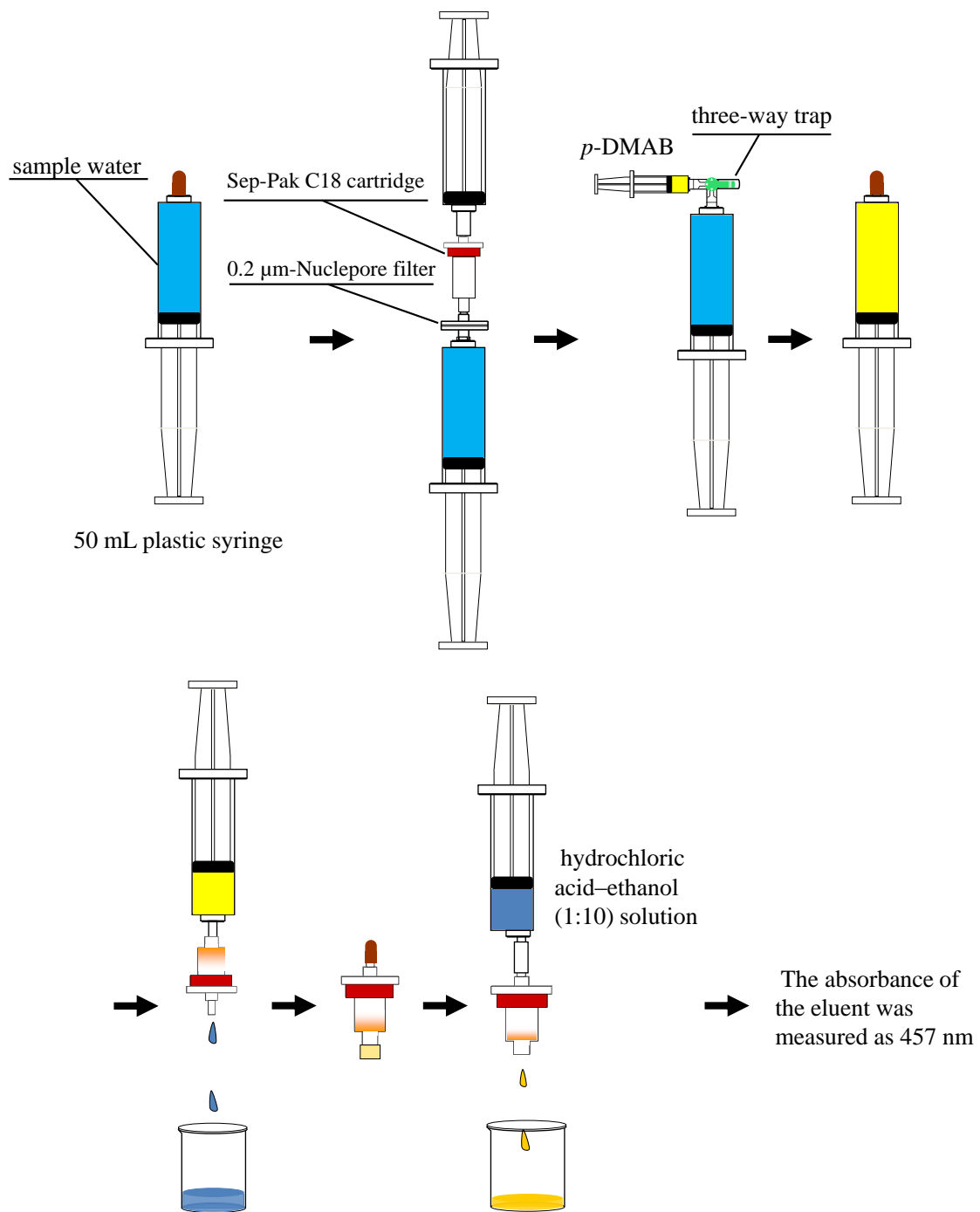


Fig. 2-2 Standard quantitative procedure for hydrazine determination.

## 結果と考察

### 吸収スペクトル

溶離液中のアルダジンの吸収スペクトルを Fig. 2-3 に示す。アルダジンは 457nm に吸収極大を有する。この波長では、試薬ブランクの吸光度は無視できる。したがって、本研究では全ての吸光度測定を 457 nm で行った。

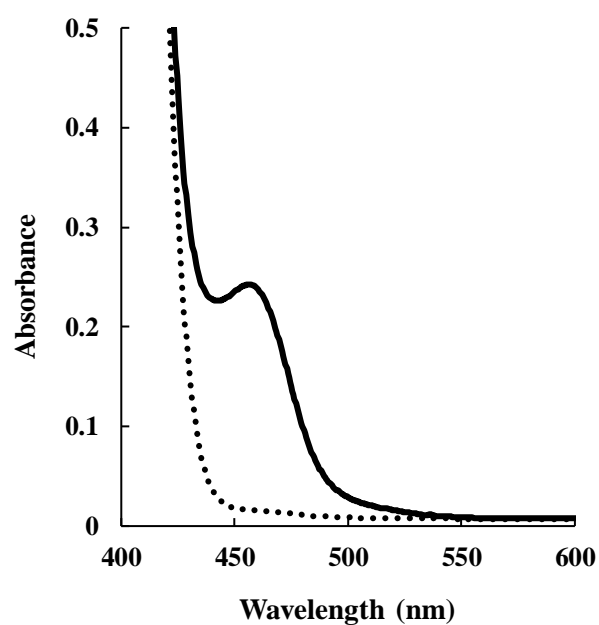


Fig. 2-3 Absorption spectra of aldazine, formed from hydrazine, in eluent (reference: water) .

Solid line, hydrazine: 5 µgN L<sup>-1</sup>; Dotted line, reagent blank.

### Sep-Pak への吸着

ヒドラジンから生成したアルダジンの Sep-Pak C18 への吸着を、標準的な手順に従ってヒドラジンとして 10 µgN L<sup>-1</sup> を含む溶液を通過させることによって試験した。生成したアルダジンを Sep-Pak C18 カートリッジに定量的に吸着させた。ブレイクスルー法を用いる

ことによって、Sep-Pak C18 カートリッジは十分な吸着容量を有することが見出され、少なくとも 2.0  $\mu\text{gN}$  のヒドラジンに対応するアルダジンを回収することができた。

アルダジンを吸着した Sep-Pak C18 カートリッジを 25°C の暗所に保存し、2 日間にわたって、カートリッジ上のアルダジンの安定性を調べたところ、アルダジンは Sep-Pak C18 上で少なくとも 12 時間安定であった (Fig. 2-4)。しかし、24 時間以上の溶離液には液中に沈殿物が形成され、吸光度の増加が生じた。これより、Sep-Pak C18 に吸着させたアルダジンを 12 時間以内に溶離することとした。

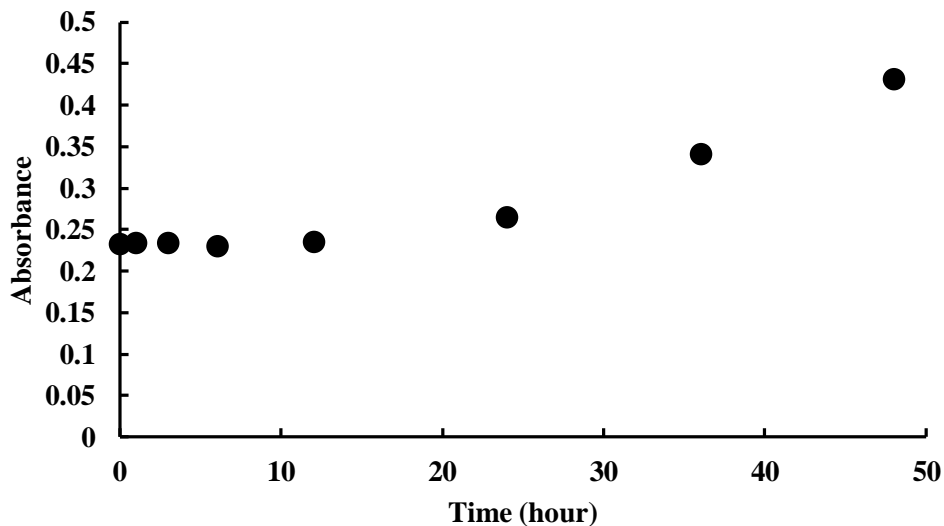


Fig. 2-4 Stability of aldazine adsorbed on Sep-Pak C18 cartridge.

#### 溶離液

Sep-Pak C18 に吸着させたヒドラジン 0.25  $\mu\text{gN}$  に相当するアルダジンの溶離を、エタノールおよびアセトンを用いて検討した。アセトンは吸着したアルダジンを溶離できたが、黄色の溶離液はすぐに退色反応を起こした。エタノールは Sep-Pak C18 からアルダジンをほぼ完全に溶離したが、溶離液中に沈殿物が形成された。エタノールに 12M 塩酸溶液を添



加したところ、沈殿物の溶解が生じ、アルダジンの溶離を改善することができた。沈殿物の形成は、85～95% (v/v) のエタノールに 12M 塩酸が 5～15% (v/v) になるよう調製した溶離液を使用することによって防ぐことができ、Fig. 2-5 に示すように、アルダジンを十分に溶出した。本研究では、エタノールと 12M 塩酸 (10 : 1, v/v) の混合物を溶離液として使用した。アルダジンを含む溶離液の吸光度は、少なくとも 2 時間は安定であった。

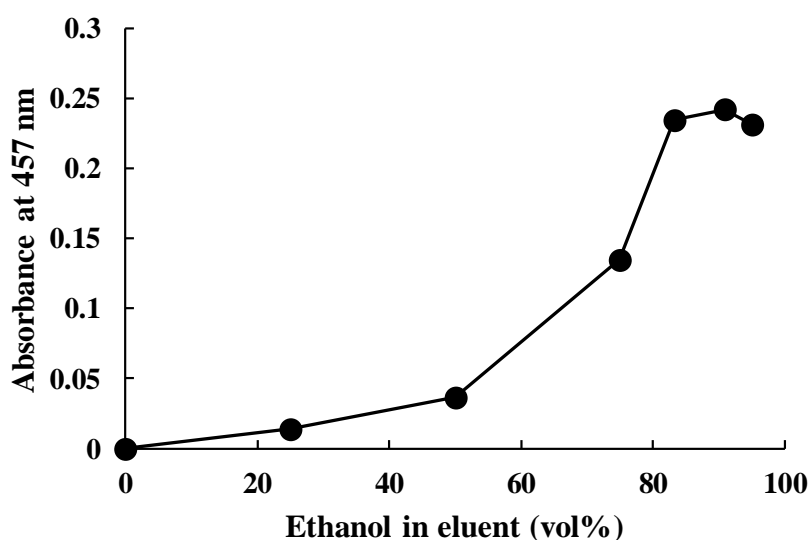


Fig. 2-5 Elution of aldazine, formed from hydrazine, with 8 mL of ethanol-12 M hydrochloric acid.

### 流速の影響

アルダジンの吸着に及ぼす流速の影響を調べるために、 $10 \mu\text{gN L}^{-1}$  のアルダジン溶液 50mL を Sep-Pak C18 カートリッジに通し、Sep-Pak C18 カートリッジを通過する溶出液中のアルダジン濃度を測定し、下式より吸着率を求めた。

$$\text{吸着率 (\%)} = \frac{C_0 - C_{\text{eff}}}{C_0} \times 100$$

$C_0$ : 試料水の始めのアルダジン濃度 ( $\mu\text{gN L}^{-1}$ )、 $C_{\text{eff}}$ : 流出液中のアルダジン濃度 ( $\mu\text{gN L}^{-1}$ )

Fig. 2-6 に示すように、流速が 2~9 mL min<sup>-1</sup> であるとき、アルダジンは定量的に吸着された。したがって、現場での操作では、手動による Sep-Pak C18 カートリッジへの通水速度が変化しても問題ないことがわかった。なお、Sep-Pak C18 カートリッジに吸着されたアルダジンは、10 mL min<sup>-1</sup> で容易に溶離できた。

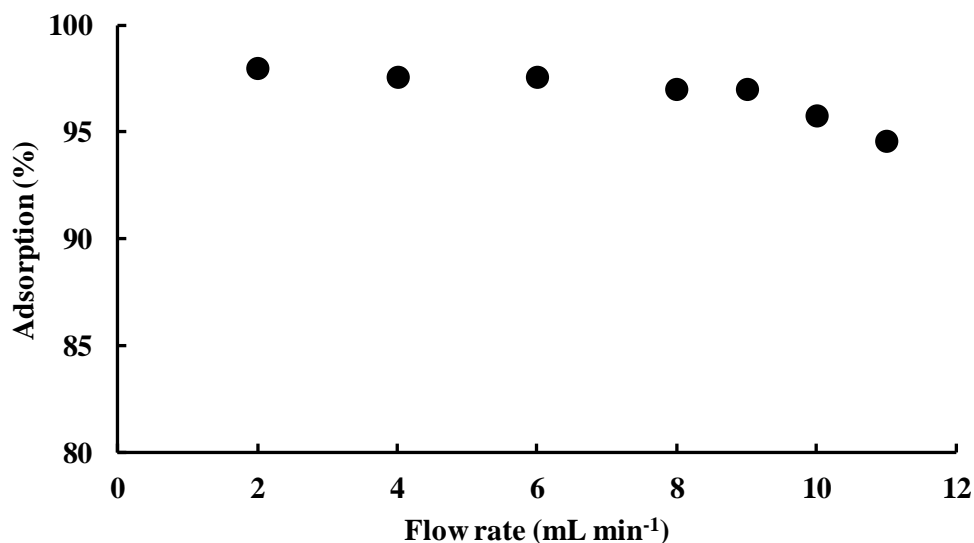


Fig. 2-6 Effect of flow rate on aldazine adsorption.

### 検量線と精度

検量線は、溶離液 8 mL 中のアルダジン 1.0 µgN まで直線的だった。アルダジン 5.0 µgN L<sup>-1</sup> あたりの吸光度は、457nm で 0.245 であった。Sep-Pak C18 カートリッジに吸着された 1.0 µgN までのヒドラジンの量に対応するアルダジンを、8mL の溶離液で定量的に溶離させることができた。5.0 µgN L<sup>-1</sup> のアルダジンの相対標準偏差は 3.6% であった。

## 妨害物質の抑制

発色剤として使用される化合物 *p*-DMAB は、環境水中に存在する尿素および硫化水素と反応することが知られている。そこで、本法の分析への影響を調べた。尿素標準溶液（100 mgN L<sup>-1</sup>）および硫化水素標準溶液（100 mgS L<sup>-1</sup>）は希塩酸（1:99）で希釈して調製した。Fig. 2-7 は、尿素と硫化水素を *p*-DMAB で発色させたもの（Sep-Pak 通水前）、それを Sep-Pak に通水した時の流出液と溶離液のスペクトルを示している。尿素と硫化水素を *p*-DMAB で発色させたものは約 457nm で吸収波長があるのに対し、流出液および溶離液は共に、約 457nm でのブランクと同等の値を示した。したがって、Sep-Pak カートリッジを使用することにより、ヒドラジンの定量における尿素および硫化水素による妨害を抑制することができた。したがって、本法は、Sep-Pak C18 を使用することにより、高濃度の尿素および硫化水素を含む環境水中のヒドラジン濃度の定量にも使用することができる。

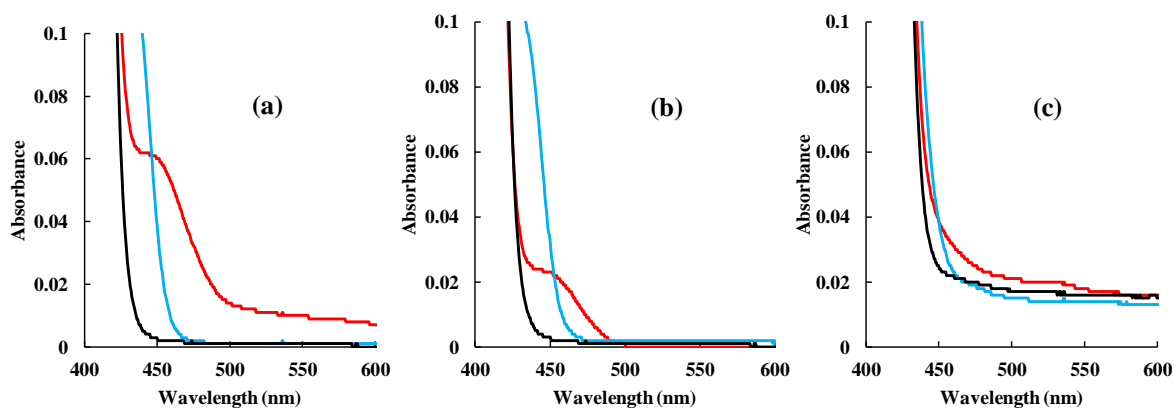


Fig. 2-7 Effect of urea and hydrogen sulfide on (a) colored sample (passed through the Sep-Pak before), (b) effluent, and (c) eluent of the proposed method.

Blue line, hydrogen sulfide; red line, urea; black line, reagent blank.

また、本法を汽水試料及び海水試料に適用する目的で、人工海水を用いてヒドラジンの定量に及ぼす塩分の影響を検討した。海水には  $\text{Na}^+$ 、 $\text{Mg}^{2+}$ 、 $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{K}^+$ 、 $\text{Cl}^-$ 、 $\text{SO}_4^{2-}$  が非常に高濃度 ( $\text{g L}^{-1}$  程度) で含まれている。人工海水は Riley and Skirrows (1965) の手順に従って調整した (第 1 章参照)。人工海水を希釈することで 0~35 psu に希釈し、これを用いてヒドラジニウムイオン標準溶液 ( $10 \mu\text{gN L}^{-1}$ ) を調製し定量を行った。その結果ヒドラジンの定量は、海水などの高塩分 (34‰) でも影響を受けなかった (Fig. 2-8)。

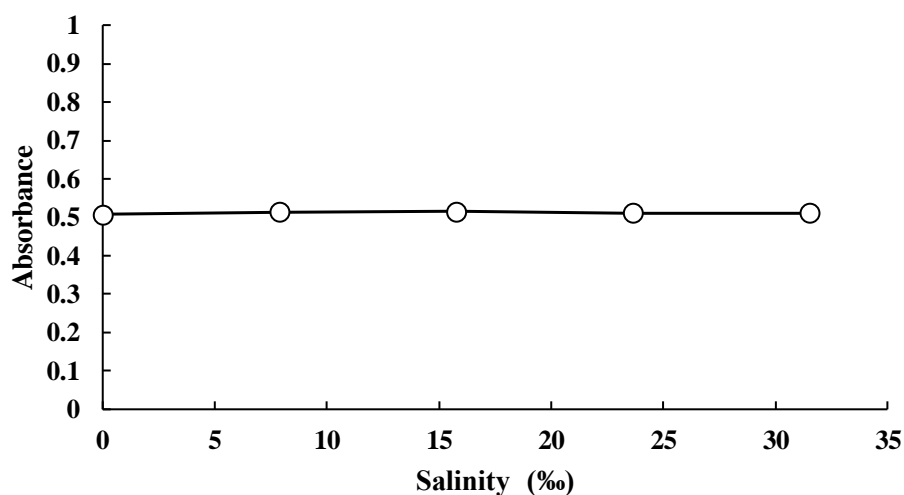


Fig. 2-8 Effect of salinity (artificial seawater) on the absorbance : hydrazine :  $10 \mu\text{gN L}^{-1}$  .

### 有機物の除去

環境水中に存在する溶存有機物の影響について検討した。有機物の除去として、Sep-Pak C18 カートリッジを用い、環境水を *p*-DMAB で発色させる前に除去操作を行った。試料溶液として農業集落排水処理施設の排水を 50mL の目盛り付きシリンジに 50mL 採水した。これを  $0.2 \mu\text{m}$  のコマ型ろ紙を用いたろ液及び  $0.2 \mu\text{m}$  のコマ型ろ紙でろ過した後、Sep-Pak C18 カートリッジに通水して得られた溶出液を *p*-DMAB で発色させ、それぞれのスペクト

ルを測定した (Fig. 2-9)。ろ液は 457nm 付近に大きな吸収を示すが、Sep-Pak C18 カートリッジに通水した流出液には吸収波長が見られなかった。これより、Sep-Pak C18 カートリッジを用いることで有機物の妨害を防ぐことが可能となった。Sep-Pak C18 カートリッジを発色前に使用することで排水中の有機物を除去でき、ヒドラジンの定量を行うことが可能であることが分かった。

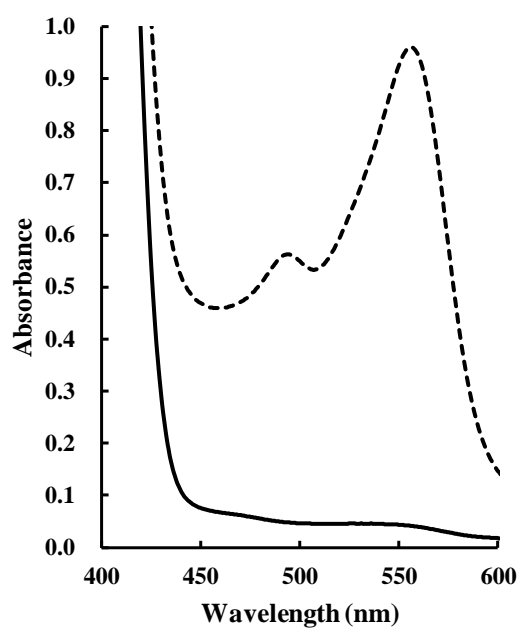


Fig. 2-9 Absorption spectra of waste water.

Dotted line, only filtration with 0.2  $\mu\text{m}$ -Nuclepore filter; solid line, passed through the Sep-Pak C18 *via* the filter.

## 回収率と再現性

ヒドラジンの回収率は、環境水にヒドラジン ( $10 \mu\text{gN L}^{-1}$ ) を添加したものをを用いて調べた。Table 2-1 に示すように、2.0~3.0%の標準偏差 (RSD) でヒドラジンを定量的に回収した。ヒドラジンの回収率は92~98%の範囲であり、再現性のよい良好な結果を得た。

Table 2-1 Recovery of hydrazine added to fresh-water<sup>a</sup>, brackish-water<sup>b</sup>, and waste-water<sup>c</sup>.

Sample	Added/ $\mu\text{gN L}^{-1}$	Found/ $\mu\text{gN L}^{-1}$	Recovery %	RSD (n=5) %
Fresh-water	0	< 0.2	-	-
	10	10.1	98.8	2.8
Brackish-water	0	< 0.2	-	-
	10	9.3	91.9	2.0
Waste-water	0	0.5	-	-
	10	10.2	97.2	3.0

a. Fresh water sample was taken from the Asakumi River in Matsue, Japan

b. Brackish water sample was taken from brackish Lake Nakaumi, Japan.

c. Wastewater sample was taken from a combined type sewage treatment system in Matsue, Japan.

## 環境水への適用

本法を 2014 年 8 月 21 日に採取した島根県東部に位置する汽水湖中海の水試料に適用した。各水試料を 2 つに分けた。1 つを本法に、もう 1 つを従来法 (JIS B8224) に用いて、従来法との比較を行った。北原式採水器を用いてサンプルを得た後、採水器に接続したシリコンチューブから目盛付き 50 mL プラスチックシリンジに、空気と接触することなく採水した。本法では、Sep-Pak C18 カートリッジを用いたヒドラジン定量の全ての操作を、湖の小さなボート上で行った。Sep-Pak C18 カートリッジをシリコン栓及びゴム栓で密閉して実験室に持ち帰り、実験室で溶離および吸光光度測定を行った。従来法については、船上でサンプル溶液の発色を行った後、これをそのまま実験室に持ち帰り吸光光度測定を行った。Sep-Pak C18 カートリッジに吸着したアルダジンの安定時間は約 12 時間である。本法では、発色後 Sep-Pak C18 カートリッジに吸着させたサンプルを実験室に持ち帰り、試料採取から 5 時間以内に吸光度を測定した。本法と従来法の比較を行ったところ、従来法では、全試料のヒドラジン濃度が検出限界 ( $2.0 \mu\text{gNL}^{-1}$ ) を下回る結果であったのに対し、本法では、深くなるにつれてヒドラジン濃度が増加する傾向を捉えることができた (Table 2-2)。

さらに、 $\text{NH}_4^+$ 、 $\text{NO}_2^-$ 、 $\text{NO}_3^-$  の測定用に試料水をポリエチレンボトルに採取した。これを船上でろ過し、実験室に持ち帰り分析を行った。ヒドラジン、 $\text{NH}_4^+$ 、 $\text{NO}_2^-$ 、 $\text{NO}_3^-$  の測定結果を Fig. 2-10 に示す。ヒドラジン濃度は深度 3 m 以深で増加し、深度 5~6.5m で最も高い値 ( $1.0 \mu\text{gN L}^{-1}$ ) を示した。 $\text{NH}_4^+$  と  $\text{NO}_2^-$  の何れも深度が深くなるにつれて濃度が増加する傾向を示した。 $\text{NH}_4^+$  は湖底堆積物からの溶出に由来し、 $\text{NO}_2^-$  は亜硝酸酸化細菌の光阻害によって蓄積する (清家ら、1997) ものと考えられる。本研究により、アナモックス反応の基質であるアンモニアと亜硝酸が中海の底層付近に豊富に存在することを確認するとともに、アナモックス反応の中間体であるヒドラジンの検出に初めて成功した。

Table 2-2 Results of the determination of hydrazine in brackish water sample taken from Lake Nakaumi on August 21, 2014.

Depth / m	Hydrazine / $\mu\text{gN L}^{-1}$	
	Proposed method	Conventional method <sup>9</sup>
0	0.3	< 2.0
1	0.3	< 2.0
2	0.3	< 2.0
3	0.5	< 2.0
4	0.6	< 2.0
5	1.1	< 2.0
6	1.0	< 2.0
6.5	1.1	< 2.0



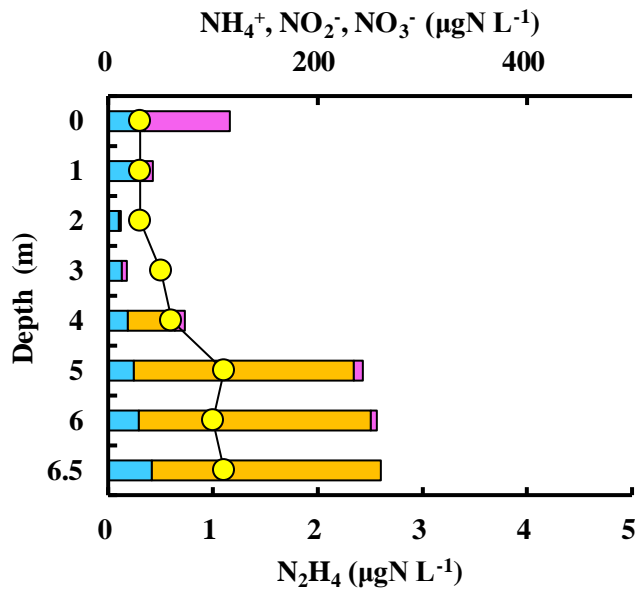


Fig. 2-10 Vertical distribution of hydrazine, ammonium, nitrite, and nitrate in brackish Lake Nakaumi on August 21, 2014.

●, hydrazine; ■, ammonium; ■, nitrite; ■, nitrate.

## 結論

Sep-Pak C18 カートリッジを使用した固相抽出法を用いて、環境水中でのヒドラジンの現場での簡単で迅速な濃縮および溶離による新規定量法を開発した。本法は、ヒドラジンを現場で *p*-DMAB と反応させてアルダジンを生成させ、形成されたアルダジンを Sep-Pak C18 カートリッジを用いて固相抽出を行う方法である。アルダジンを吸着させた Sep-Pak C18 カートリッジを実験室に持ち帰り、塩酸-エタノール (1:10) 溶液を用いて溶離し、その溶離液の吸光度を 457 nm で測定した。本法は、従来法と比較して 6.25 倍のアルダジンを濃縮することができる。また本法は、淡水から海水までの高塩分範囲で適用でき、さら

に Sep-Pak C18 カートリッジを使用してサンプル中の有機物を除去することで、排水のよ  
うな汚水にも適用可能である。

本法を汽水湖中海に用いたところ、底層において、アナモックス反応の中間体であるヒ  
ドラジンが高濃度検出され、かつアナモックス反応の基質であるアンモニウム塩、亜硝酸  
塩が高濃度に存在していたことから、アナモックス反応が生じていることが立証された。

### 第3章 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

#### はじめに

窒素は、地球上の生命を制限する主要な栄養素であり、全ての生物の必須元素である。しかし、ほとんどの生物は、増殖のためには、大気中の窒素ガスではなく、アンモニウム塩や硝酸塩のような生物学的に利用可能な形態の窒素に頼っている (Kuypers et al., 2018)。これらの基質は微生物の窒素代謝反応に依存している。この反応は非常に多様であり、ここ最近では、光合成亜硝酸塩酸化 (Griffin et al., 2007)、ヒドラジンの合成 (Kartal et al. 2011)、硝酸塩への完全アンモニア酸化 (コナモックス) (Daims et al., 2015; Kessel et al., 2015)、ヒドロキシルアミンの酸化窒素への酸化 (Caranto et al., 2017) などが発見されている。

アナモックス反応は、1995年にデルフト工科大学の研究グループによって脱窒流動床内部の窒素収支の検討をもとに報告された (Mulder et al., 1995)。その後、アナモックス細菌は *Planctomycetales* に属することが明らかにされ (Koch et al., 2000)、アナモックス細菌が自然界に広く分布していることがわかった (Straus et al., 1999)。2003年には黒海の水塊中にアナモックス細菌が存在し、アナモックス反応によって  $N_2$  ガスを生成していることが証明された (Kuypers et al., 2003)。また、世界各地の海水中 (Hamasaki et al., 2018) においてアナモックス反応や関連細菌に関する報告がなされている。海洋における  $N_2$  ガスの 50% がアナモックス反応によって生成されているという報告もある (Dalsgaard et al., 2005)。また、アナモックス細菌は多くの湿地生態系に広く分布しており (Hou et al. 2013, Hamersley et al. 2009, Dale et al. 2009)、窒素の生成の 20% を占めていると言われている (Gao et al. 2018)。したがって、地球全体の窒素循環を考える上で、アナモックス反応は硝化・脱窒と並んで重要な反応である。また、硝化・脱窒の過程で生成される  $N_2O$  は温暖化ガスの一つであり、地球温暖化に深く関わっている。一方、アナモックス反応はこの  $N_2O$  を生成しないことか

ら地球環境にとって望ましい窒素除去プロセスであるといえる。

アナモックス反応のプロセスには、中間体として  $N_2H_4$  が形成されることが報告されている (Kartal et al., 2016; Oshiki et al., 2016)。この反応機構において、Kartal et al. (2016)は  $NH_4^+$  と  $NO$  を利用し、 $N_2H_4$  を中間体として形成すると報告している。一方、Van de Graaf et al. (1997)は、 $NH_4^+$  と  $NO$  ではなく、 $NH_4^+$  と  $NH_2OH$  から  $N_2H_4$  を形成する経路を提示し、Oshiki et al. (2016)がその経路の存在を実証している。Kobayashi et al. (2019)は、この経路の違いがアナモックス細菌の種の違いによるものであり、アナモックス細菌”*Ca. Scalindua Japomnica*”や”*Ca. Jettenia caeni*”は  $NO$  を利用し、”*Ca. Brocadia sinica*”は  $NH_2OH$  を利用する、と報告している。何れの反応も、最終的には、 $N_2H_4$  が 4 電子を放出し、窒素ガスに変化する。そこで我々は、Oshiki et al. (2016)の発見したアナモックス反応の中間体 ( $N_2H_4$  と  $NH_2OH$ ) に注目し、既存の方法(JIS B8224; Seike et al., 2004)を改良することで、新規な  $N_2H_4$  の濃縮定量法 (本論文の第 2 章, Kato et al., 2017a) と汽水域にも適用可能な  $NH_2OH$  の定量法 (本論文の第 1 章, Kato et al., 2017b) を開発した。

汽水域では、これまで河口堆積物中のアナモックスに関する研究は多く行われてきたが (Trimmer et al., 2003; Risgaard-Petersen et al., 2004; Tal et al., 2005; Rich et al., 2008; Nicholls and Trimmer, 2009; Amano et al., 2011; Li et al., 2011; Teixeira et al., 2012)、ウォーターカラムにおける研究はほとんどない。本研究では、今まで測定できなかったアナモックス反応の中間体に着目し、我々の開発した定量法を汽水湖中海のウォーターカラムに適用することで、その挙動を知ることを目的に検討した。また、中間体に加えて無機態窒素 (DIN) の挙動から、汽水湖中海におけるアナモックス反応の特性について検討した。

また、環境水中のアナモックス活性の測定には  $^{15}N$  窒素同位体を用いた測定が一般的である。この方法は煩雑で高価な機器を必要とし、環境水中の微弱なアナモックス活性を測定するためには、かなり洗練された実験環境と技術を要する。そこで、アナモックス反応による窒素除去量を求めるために、アセチレン阻害法 (Yoshinari et al. 1977) を用いた培養

を試みた。アセチレンを添加することで、脱窒反応による窒素除去量は  $\text{N}_2\text{O}$  の増加量から求めることができる。一方、アナモックス反応による窒素除去量を  $\text{N}_2\text{O}$  を含めた DIN の減少量から推定できると考えた。そこで、アセチレン阻害法を併用した環境水の培養を行うことでアナモックス反応の窒素除去量を求める新規の定量法を考案し検討した。この手法は、培養期間中のアナモックス反応の中間体 ( $\text{NH}_2\text{OH}$  と  $\text{N}_2\text{H}_4$ ) を測定することでアナモックス反応の有無を確認するとともに、 $\text{N}_2\text{O}$  を含めた DIN の減少量からアナモックス反応による窒素除去量を推定するものである。

## 材料と方法

### 調査地点及び調査方法

調査は島根県の東部に位置する中海の湖心 ( $35.47^\circ \text{ N}$ ,  $133.19^\circ \text{ E}$ ) において (Fig. 3-1)、2014 年 1 月から 11 月にかけて行った。2014 年 9 月 1 日には、本庄水域を含む中海の底層 (湖底上 1.0 m) 11 地点について、 $\text{NO}_2^-$  の広域調査も行った。中海は、大橋川から宍道湖の湖水が流入し、境水道から日本海の海水が流入する閉鎖性の汽水湖である。中海の面積は約  $97.5 \text{ km}^2$ 、総貯水量は約  $5.21 \times 10^8 \text{ m}^3$  である。本調査地点である中海湖心は、水深が約 7 m であり、潮汐により日本海から塩分を含んだ密度の高い海水が入るため、中層付近に温度躍層よりも強固な塩分躍層が形成される。中海の湖心は、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 7 m の底層では光がぎりぎり届く深度であり、硝化の光阻害が生じ  $\text{NO}_2^- \rightarrow \text{NO}_3^-$  のパスが阻害され、夏季には  $\text{NO}_2^-$  が蓄積される (清家ら, 1997) ことが知られている。したがって、中海では、夏季に  $\text{NO}_2^-$  の蓄積を起点にアナモックス反応が活発に起きている可能性がある。

採水は北原式採水器 (リゴ- B 号透明採水器 : 離合社製) を用いて行い、 $\text{NH}_4^+$ 、 $\text{NO}_2^-$ 、

NO<sub>3</sub><sup>-</sup> 定量用試水をポリ瓶に採取し実験室に持ち帰った。あらかじめ 450°C で焼いたガラスフィルター (ADVANTEC GS-25) を用いて濾過した後、すぐに分析を行った。N<sub>2</sub>O、NH<sub>2</sub>OH は現場ですぐに 70 mL バイアル瓶に試料水を密封し、定量操作を行った。N<sub>2</sub>H<sub>4</sub> は現場にて 50 mL プラスチックシリンジに試料水を採水し、定量操作を行った。また水中の水溫、塩分、溶存酸素 (DO)、酸化還元電位 (ORP)、濁度 (Turb)、クロロフィル 及び pH は、多項目水質計 (HYDROLAB MODEL SONDE) を用いて現場で測定した。

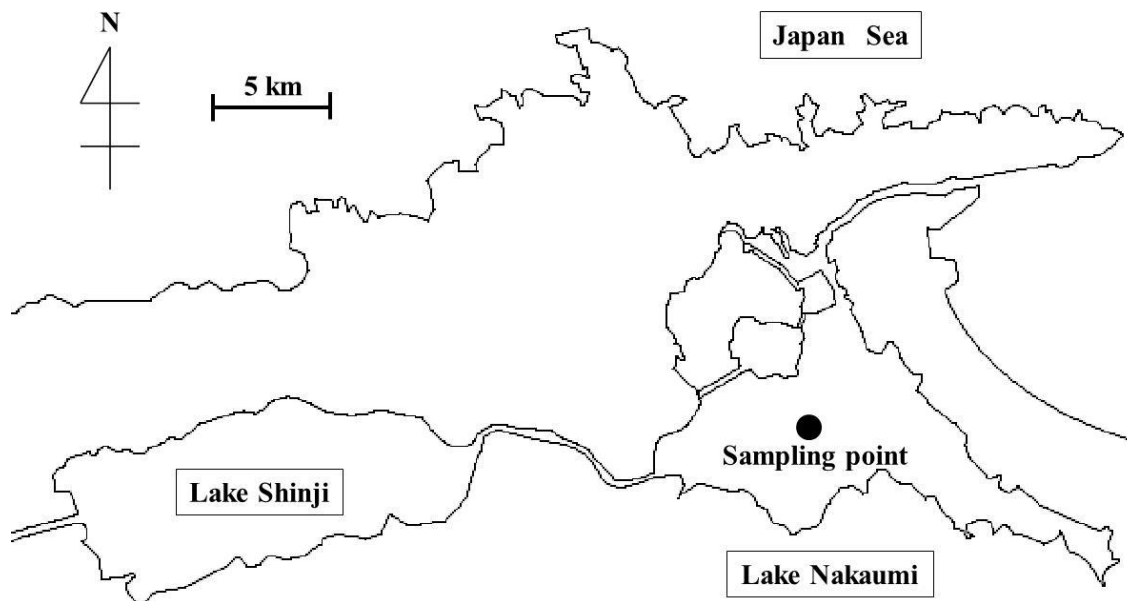


Fig. 3-1 Location of the sampling point (●) in brackish Lake Nakaumi, Japan.

### 分析方法

$\text{NH}_4^+$ 、 $\text{NO}_2^-$ 、 $\text{NO}_3^-$ はそれぞれ、インドフェノール青法 (Sagi, 1966)、ナフチルエチレンジアミン法 (Bendschneider and Robinson, 1952)、Cd-Cu アマルガム-ナフチルエチレンジアミン法 (Wood et al.1967) を用いて定量した。これらは Shimadzu UV-1800-type 吸光度計を用いて測定した。

$\text{NH}_2\text{OH}$  は本論文第 1 章の方法に従い以下のように行った。試料は、70 mL の褐色ガラスバイアル瓶に入れた。バイアル瓶に空気が入らないようにブチルゴムとアルミシールで密封した。次に、63.6 mM のフェノール溶液 1.0 mL と 3.5 mM の次亜塩素酸溶液 1.5 mL を添加し (Fig. 1-1)、 $\text{NH}_2\text{OH}$  を  $\text{N}_2\text{O}$  に酸化させた。あらかじめバイアル瓶の中に入れていたガラスビーズで溶液を混合させた。生成した  $\text{N}_2\text{O}$  をヘッドスペース法を用いて定量した。ヘッドスペースは 99.9 % の純窒素をマグナムシリンジを使用して作成した (Fig. 1-1)。数

分間バイアル瓶を振り混ぜた後、気相中の  $\text{N}_2\text{O}$  を ECD つきガスクロマトグラフで測定した。液相中の  $\text{N}_2\text{O}$  濃度は Weiss and Price の式 (1980) から算出した。試料中の  $\text{N}_2\text{O}$  ブランクは、フェノール溶液と次亜塩素酸溶液の添加なしで測定した。 $\text{NH}_2\text{OH}$  はフェノール溶液と次亜塩素酸溶液で生成した  $\text{N}_2\text{O}$  から  $\text{N}_2\text{O}$  ブランクを引くことで求めた。ガスクロマトグラフでの  $\text{N}_2\text{O}$  の定量下限は  $0.2 \mu\text{gN L}^{-1}$  であった。

$\text{N}_2\text{H}_4$  は本論文第 2 章の方法に従い以下のように行った。Sep-Pak C18 は捕集操作を行う直前にコンディショニングを行った。コンディショニングには Sep-Pak C18 にエタノール 8 mL、50%エタノール 5 mL、水 10mL を順次通し行った。その際の流速は  $5 \text{ mL min}^{-1}$  で行った。コンディショニングした Sep-Pak C18 は乾燥を防ぐためにシリコン栓及びゴム栓で密閉して保存した。

ヒドラジン含有水 50 mL を 50 mL 用シリンジに採取した。これを、 $0.2 \mu\text{m}$  のコマ型ろ紙 (ADVANTEC 社製、直径 25 mm) とコンディショニングした Sep-Pak C18 を用いてろ過を行った。そして、シリンジ内に 10 mL プラスチックシリンジを用いて発色試薬である *p*-DMAB 溶液 6 mL を三方活性 (テルモ社製) を介して添加した後、10 分間放置した。放置後、試料溶液 50 mL を Sep-Pak に通した。なお、試料溶液をカラムに通す際の通水速度は  $8 \text{ mL min}^{-1}$  で行った。現場では計時しながら、手動で流速を調整した。そして、シリコン栓及びゴム栓で密閉し実験室に持ち帰った。次に溶離液として塩酸・エタノール (1:10) 混合溶液 8 mL を、溶離を容易にするために吸着操作とは逆方向から Sep-Pak に通水速度  $10 \text{ mL min}^{-1}$  で通して、溶離させた。溶離後すぐに溶離液の 457 nm の吸光度を吸光度計で測定し、検量線によりヒドラジンの濃度を定量した (Fig. 2-2)。

カラムに溶液を通す際の通水速度は、実験室においてはカセットチューブポンプの使用により調整した。



## 培養実験

2015年11月19日に中海湖心の底層（深度 6.0 m）から採水した試料水を実験室に持ち帰り、 $\text{NO}_2^-$ と $\text{NH}_4^+$ が $100 \mu\text{gN L}^{-1}$ になるよう $\text{NaNO}_2$ と $\text{NH}_4\text{Cl}$ を添加して窒素置換を行い、アセチレンを添加した。これを内径 10 cm 長さ 40 cm の遮光したアクリルコアに移し、空気が入らないよう、ゴム栓で密封した。ペリスターポンプを用いて循環させながら、 $25^\circ\text{C}$ の暗所において培養を行った（Fig. 3-2）。培養開始から1日目、3日目、8日目において分析に必要な量の試料をタイゴンチューブから採取し、 $\text{NH}_4^+$ 、 $\text{NO}_2^-$ 、 $\text{NO}_3^-$ 、 $\text{N}_2\text{O}$ 、 $\text{NH}_2\text{OH}$ 、 $\text{N}_2\text{H}_4$ 及びDOについて分析を行った。試料の採取は、培養開始時と同じ手順で調製した中海湖心の底層水（アセチレン添加あり）を加えながら行った。この新たに加えた底層水は培養全体の量の5%程度であった為、影響は少ないと考えられる。

アセチレンを試料水に添加することで、硝化における $\text{NH}_4^+$ から $\text{NH}_2\text{OH}$ への反応と $\text{NH}_2\text{OH}$ から $\text{NO}_2^-$ と $\text{N}_2\text{O}$ への反応を阻害する（Fig. 3-3）。また、脱窒における $\text{N}_2\text{O}$ から $\text{N}_2$ への還元を阻害し $\text{N}_2\text{O}$ を蓄積する。その $\text{N}_2\text{O}$ 量を定量することで、脱窒による窒素除去量を算出した。また、 $\text{N}_2\text{O}$ を含めたDINの減少量からアナモックス反応によって除去された窒素除去量を推定した。

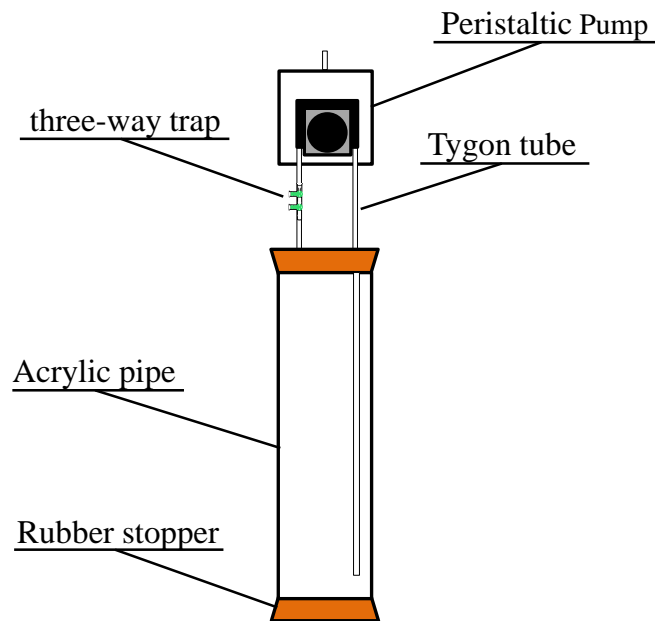


Fig. 3-2 Setup for Incubation with Acrylic pipe

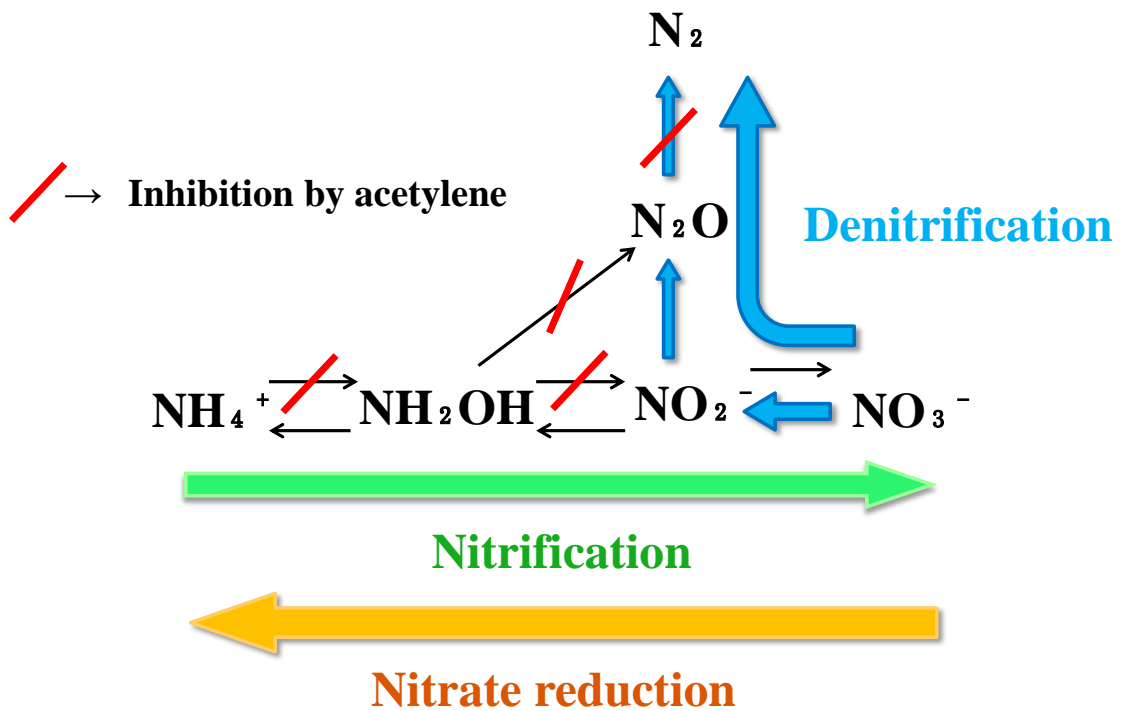


Fig. 3-3 Inhibition by acetylene to nitrification and denitrification

## 結果と考察

### 中海湖心の底層における無機態窒素の経月変化

中海湖心 (Fig.3-1) の底層 (湖底上 0.5 m) における 2014 年の塩分、水温、溶存酸素 (DO) および溶存無機態窒素 (DIN) の経月変化を Fig. 3-4 に示す。底層の塩分は 25~31 psu の範囲にあり海水に近い値を示した。水温は 10~25°C の範囲にあるが、8 月から 9 月にかけて高く (25°C)、それに呼応して DO は低下する傾向を示した (Fig. 3-4a)。しかしながら、後述するように継続的な無酸素状態には至らなかった (Fig.3-5)。一方、DIN についてみると、2014 年は 8 月 7 日から  $\text{NO}_2^-$  の蓄積が確認され、8 月 21 日に最も高い濃度で検出された。9 月になると  $\text{NO}_2^-$  の蓄積量は減少した。さらに、アナモックス反応の中間体である  $\text{NH}_2\text{OH}$  と  $\text{N}_2\text{H}_4$  (Astrid et al., 1997; Oshiki et al., 2016) も夏季に増加する傾向を示した (Fig. 3-4b)。このように、夏季の DO (Fig. 3-5) と水温 (Fig. 3-4) は、アナモックス細菌にとって適した環境にあり、 $\text{NO}_2^-$  の蓄積に付随し、アナモックス反応の中間体 ( $\text{NH}_2\text{OH}$ ,  $\text{N}_2\text{H}_4$ ) が形成されやすい環境にあったものと考えられる。また、9/18 には、硝化細菌が光阻害を受けているのにもかかわらず、 $\text{NO}_3^-$  が検出された。アナモックス反応は  $\text{NH}_4^+$  と  $\text{NO}_2^-$  から  $\text{N}_2$  の他に  $\text{NO}_3^-$  を生成する。よって、この時に検出された  $\text{NO}_3^-$  はアナモックス反応によって生成された可能性が高い。一方、8/7 から 8/21 にかけて有意な  $\text{N}_2\text{O}$  が検出されたことから、アナモックス反応の他に、Senga et al. (2001, 2002, 2006, 2010) が報告しているような硝化 and/or 脱窒も生じているものと考えられる。

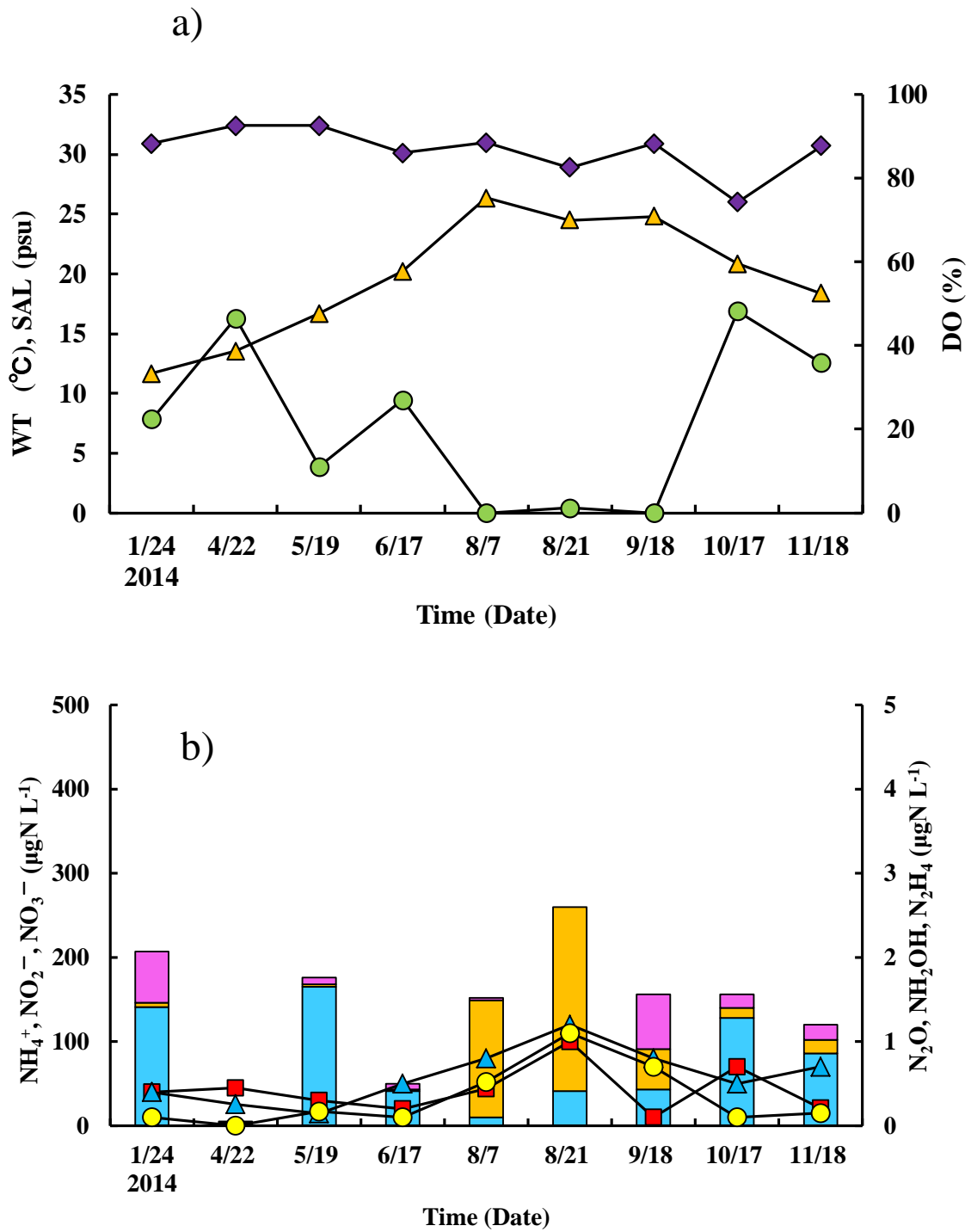


Fig. 3-4 Monthly variations of (a) water quality parameters and (b) dissolved inorganic nitrogen in bottom water (0.5 m above bottom) at the center of Lake Nakaumi.

▲, WT ◆, SAL; ●, DO; ●, N<sub>2</sub>H<sub>4</sub>; ▲, NH<sub>2</sub>OH; ■, N<sub>2</sub>O; ■, NH<sub>4</sub><sup>+</sup>; ■, NO<sub>2</sub><sup>-</sup>; ■, NO<sub>3</sub><sup>-</sup>.

## 夏季における中海湖心底層の溶存酸素の変動

DO は水温と共にアナモックス反応の Key となる重要因子である。そこで中海底層の夏季における DO の変動特性について検討した。7~9 月における中海湖心底層の塩分及び DO の経時変化（国土交通省の水門水質データベースの中海湖心観測所データ）を Fig. 3 に示す。8 月 7 日に貧酸素状態にあった DO が 8 月 9 日から 10 日にかけて上昇した。これは、強風時（8/9：平均 8.3 m/s, 最大 12.4 m/s；8/10：平均 7.6 m/s, 最大 14.6 m/s）に見られた現象であり、底層塩分の低下も見られることから、強風の影響で下層の水塊の移動及び鉛直混合が起こったことを示唆する。また、中海底層 DO の増加要因には豊富な酸素を含有する海水の流入がある。日本海からの海水の流入は、低気圧接近中など気圧が低下し続ける時に起きやすく（福岡ら, 1999）、台風の経路によっては日本海の水位が上昇し（福岡ら, 2000）、海水が流入する、ことが知られている。今回の観測では、台風以外の時にも底層 DO が頻繁に増減を繰り返すのが観察された（Fig. 3-3）。Ohtake et al. (1984) が報告しているように、中海底層 DO が上昇する現象は、境水道入口から湖心にかけてしばしば観測される。このように中海においては、気圧の変化や台風の接近だけでなく、日本海の満潮と干潮の潮位変動によって常時海水が流入・流出している。

夏季の中海の DO は、上層では植物プランクトンの活発な生産を反映して過飽和を呈する。一方、塩分躍層以深では急激に減少する。これは、汽水湖である中海では、年間を通して中層付近に塩分躍層が形成されることにより上下混合が起こりにくいためである。しかし、底層 DO は夏でも 10 - 30 % 程度存在し、継続的な無酸素状態には至らないことが分かる。これは、潮汐により日本海から酸素の豊富な海水が中海底層に流入することに起因しており、中海の底層が好氣的環境と嫌氣的環境を繰り返す所以である。このことから、夏季における中海湖心の底層では、海水の流入による無酸素層への DO 供給と光阻害による  $\text{NO}_2^-$  の蓄積（清家ら, 1997）が引き金となってアナモックス反応が生じているものと推察された。

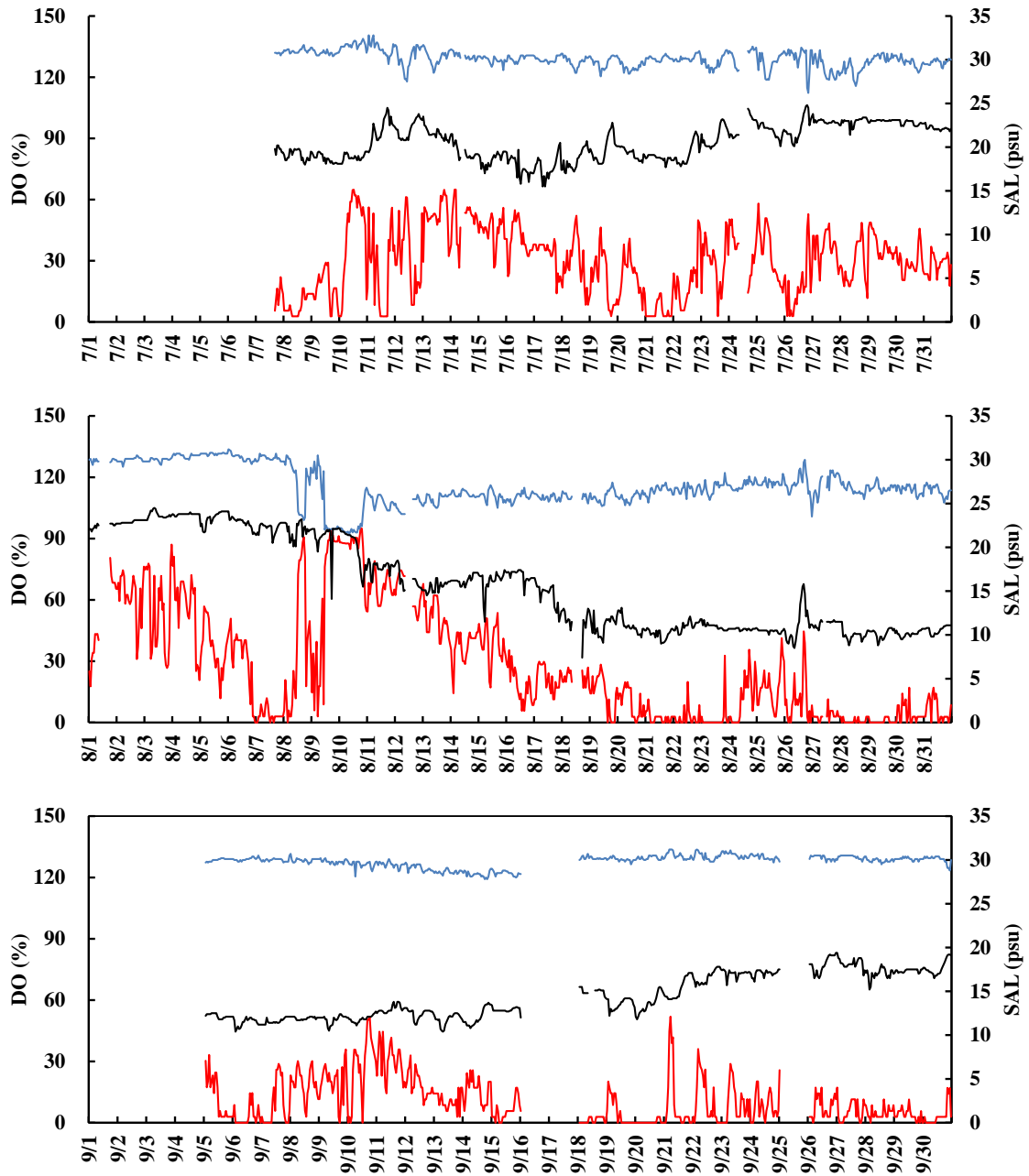


Fig. 3-5 Variations of dissolved oxygen and salinity in bottom water (0.5 m above bottom) at the center of Lake Nakaumi, July 1 to September 30 , 2014. red line, DO; Blue line, bottom SAL; Black line, surface SAL (space is data unavailability).

### 中海湖心における無機態窒素の鉛直分布

Fig. 3-6 に 2014 年の中海湖心における無機態窒素の鉛直分布を示す。1 月には、表水層で高濃度の  $\text{NO}_3^-$  が検出された。これは、Seike et al. (1990) が指摘しているように、流入河川由来のものであると考えられる。雪には高濃度の  $\text{NO}_3^-$  が含まれており、これが溶けて雪解け水となり河川水に含まれるため、冬には高濃度の  $\text{NO}_3^-$  が検出される。また、一般に植物プランクトンによる栄養塩の摂取が水温の低下と共に減少することも、 $\text{NO}_3^-$  が蓄積し易くなる要因と考えられる。また、塩分躍層より下の深水層では、湖底から溶出した  $\text{NH}_4^+$  の蓄積 (Fig. 3-6a<sub>1</sub>) や強固な塩分躍層の影響で表水層より深水層の水温が高くなる現象 (Fig. 3-6b<sub>1</sub>) が観測された。5 月には、深度 3~4 m 付近に塩分躍層が存在し、その躍層より下の深度で DO の減少が見られた (Fig. 3-6b<sub>2</sub>)。栄養塩 ( $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{NO}_2^-$ ,  $\text{NO}_3^-$ ) については、深度 0~3 m では、ほとんど検出されなかったが、深度 6 m において、湖底からの溶出による高濃度の  $\text{NH}_4^+$  が観測された (Fig. 3-6a<sub>2</sub>)。8 月には最も  $\text{NO}_2^-$  が蓄積した (Fig. 3-6a<sub>3</sub>)。  $\text{NO}_2^-$  は深度 4 m から蓄積し、5 m 以深で  $200 \mu\text{gN L}^{-1}$  ( $14.3 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) 程度蓄積していた。  $\text{NH}_2\text{OH}$  及び  $\text{N}_2\text{H}_4$  も  $\text{NO}_2^-$  と同様に、4 m 以深で増加していたことから、中海湖心では塩分躍層以深でアナモックス反応が生じているものと考えられる。中海湖心への海水による酸素供給は 5 m 以深で起きることから、海水の流入と流出による好氣的環境と嫌氣的環境の繰り返しが、中海湖心における  $\text{NO}_2^-$  の蓄積やアナモックス反応に深く関わっていることが示唆される (Fig. 3-6a<sub>3</sub>)。11 月には、深度 4~5 m 付近に塩分躍層が形成されており、それ以深で DO の減少が確認される。また 1 月と同様、塩分躍層の影響で表水層より深水層の水温が高かった (Fig. 3-6b<sub>4</sub>)。  $\text{NH}_4^+$  は、躍層下から底層にかけて増加していることから、湖底から溶出してきたものと考えられる。また躍層下では、この  $\text{NH}_4^+$  を基質として硝化反応が生じ、 $\text{NO}_2^-$  と  $\text{NO}_3^-$  が生成されたと考えられる (Fig. 3-6a<sub>4</sub>)。

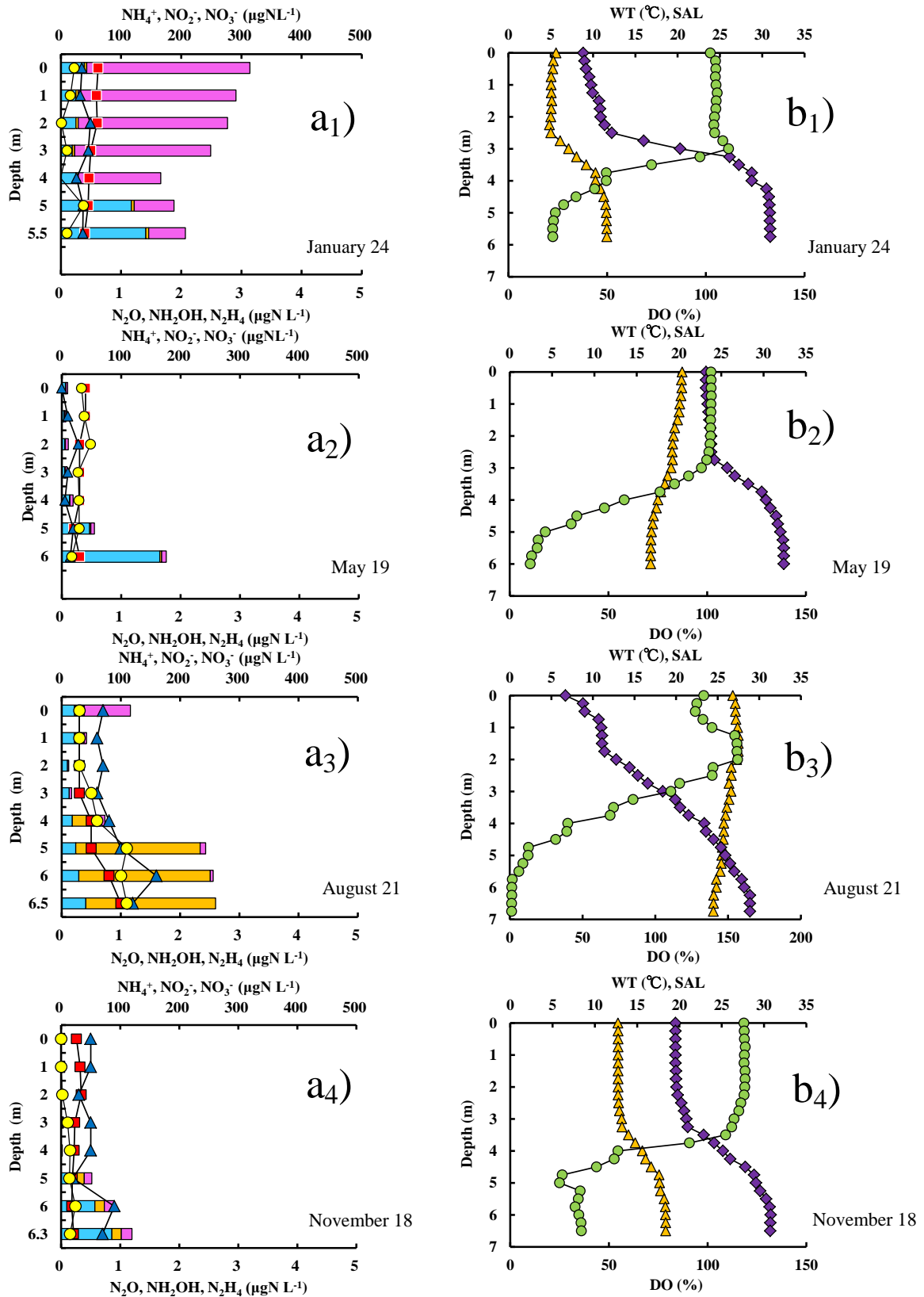


Fig. 4 Vertical distributions of (a) dissolved inorganic nitrogen and (b) water quality parameters at the center of Lake Nakaumi on January 24, April 22, August 21 and November 18, 2014.

●,  $\text{N}_2\text{H}_4$ ; ▲,  $\text{NH}_2\text{OH}$ ; ■,  $\text{N}_2\text{O}$ ; □,  $\text{NH}_4^+$ ; ▣,  $\text{NO}_2^-$ ; ▤,  $\text{NO}_3^-$ ; ▲, WT; ◆, SAL; ●, DO.



### 中海全体の $\text{NO}_2^-$ 蓄積分布

$\text{NO}_2^-$  が蓄積する機構については、清家ら (1997) によって報告されている。しかし、これまで、中海湖心における調査研究が主体であり、中海全域における  $\text{NO}_2^-$  の蓄積エリアについては調査されていなかった。中海におけるアナモックス反応を知るためには、中海全域を対象に  $\text{NO}_2^-$  が蓄積するエリア及びその要因を明らかにする必要がある。

また、中海における  $\text{NO}_2^-$  の蓄積には、潮汐により豊富な酸素を含有する日本海水の侵入が密接に関係している。これについても、中海全域において詳しく調査する必要がある。清家ら (1997) の報告の後、中海では森山堤が開削されたため、中海への日本海水の侵入が変化している可能性がある。

そこで、 $\text{NO}_2^-$  が蓄積していた 2014 年 9 月 1 日に本庄水域を含む中海の底層 (湖底上 0.5 m) 11 地点 (Fig. 3-7) の調査を行った。その結果を Fig. 3-8 に示す。中海において、境水道付近から湖心の広い範囲で  $\text{NO}_2^-$  が蓄積することがわかった。日本海からの酸素の供給が、境水道付近から中海湖心付近までであり、それよりも遠い地点は酸素の供給が少なく硝化が生じないため、 $\text{NO}_2^-$  が蓄積しないものと推察された。また、本庄水域 (H-1, H-2) は森山堤が開削されても、海水の流入が少なく酸素の供給が湖心付近よりも少ないため、嫌気的な環境であり、 $\text{NH}_4^+$  が蓄積していたと考えられる。

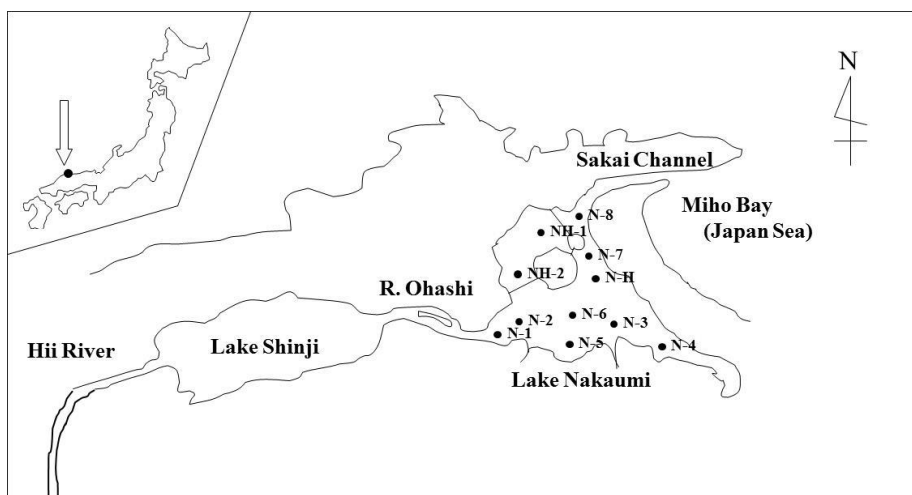


Fig. 3-7 Location of the sampling points (●) in brackish Lake Nakaumi, Japan.

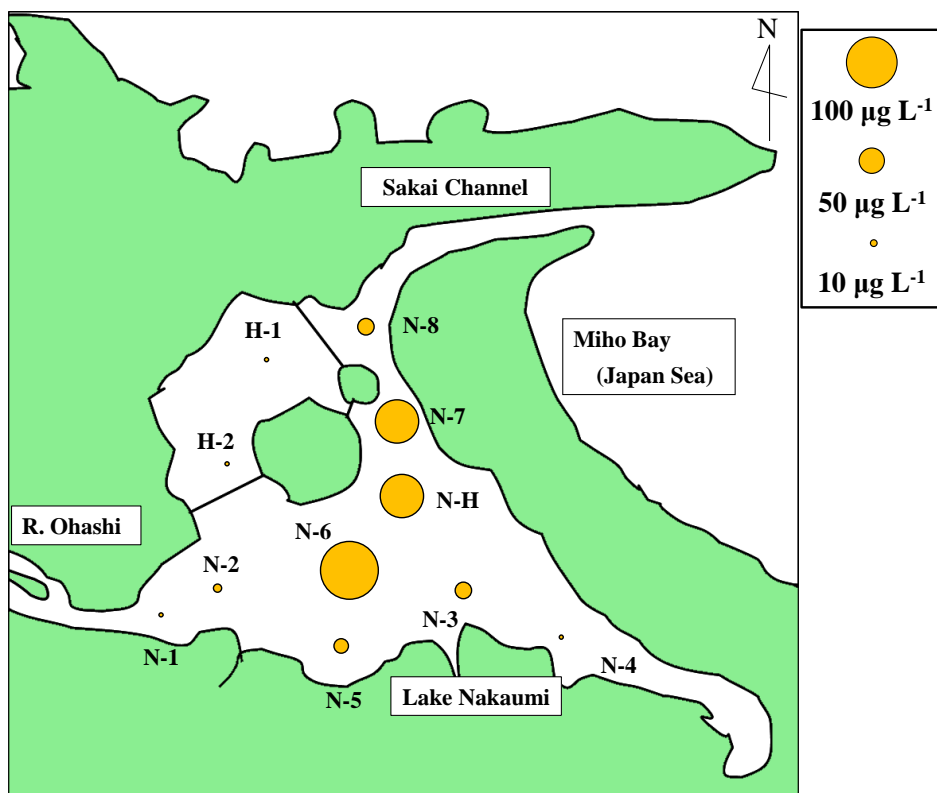


Fig. 3-8 Spatial distribution of  $\text{NO}_2^-$  in Lake Nakaumi bottom water (1.0 m above bottom) on September 1, 2014.

### 中海におけるアナモックス活性

上記のように、8月21日から9月18日までの中海の底層水中では、 $\text{NO}_2^-$ 濃度の減少に伴う  $\text{NO}_3^-$ 濃度の増加が観察された (Fig. 3-4 参照)。この期間における  $\text{NO}_3^-$ の生成速度は  $1.7 \mu\text{g N L}^{-1} \text{d}^{-1}$ であった。蓄積した  $\text{NO}_3^-$ がアナモックス反応のみから生成したものと仮定し、アナモックス反応により生成された  $\text{NO}_3^-$ を基準にアナモックス反応による窒素除去量 ( $\text{NH}_4^+$ および  $\text{NO}_2^-$ から  $\text{N}_2$ へ) を算出した。アナモックス反応において、生成される  $\text{NO}_3^-$ 量 (A) と窒素除去量 (B) の比率 (B/A) は、アナモックスプロセスの化学量論式 (Lotti

et al.,2014) と実験結果 (Kobayashi et al., 2019) を用いた。前者は 12.3、後者は 11.2 (Ca. *Brocadia sinica*) であった。その結果、地中海の  $\text{NO}_3^-$  の生成速度 ( $1.7 \mu\text{gN L}^{-1} \text{d}^{-1}$ ) から推定されるアナモックス反応による窒素除去速度は、底層水中で約  $20 \mu\text{gN L}^{-1} \text{d}^{-1}$  ( $1.4 \mu\text{molN L}^{-1} \text{d}^{-1}$ ) と計算された。黒海では、亜酸素帯域のアナモックスによる窒素除去率が  $0.10 \mu\text{gN L}^{-1} \text{d}^{-1}$  ( $0.007 \mu\text{molN L}^{-1} \text{d}^{-1}$ ) であると報告されている (Kuypers et al., 2003)。さらに、ナミビア沖の OMZ (酸素最小ゾーン) では、アナモックス活性は  $2.0\sim 6.9 \mu\text{gN L}^{-1} \text{d}^{-1}$  ( $0.144\sim 0.496 \mu\text{molN L}^{-1} \text{d}^{-1}$ ) であり、ペルー沖の OMZ では  $0.35\sim 1.5 \mu\text{gN L}^{-1} \text{d}^{-1}$  ( $0.025\sim 0.108 \mu\text{molN L}^{-1} \text{d}^{-1}$ ) であった (Kalvelage et al., 2011)。ここでアナモックス反応の Key となる  $\text{NO}_2^-$  濃度を比較すると、地中海で最も高かった  $\text{NO}_2^-$  濃度  $220 \mu\text{gN L}^{-1}$  ( $15.7 \mu\text{molN L}^{-1}$ ) は、黒海の  $4.9 \mu\text{gN L}^{-1}$  ( $0.35 \mu\text{molN L}^{-1}$ )、ナミビア沖 OMZ の  $57 \mu\text{gN L}^{-1}$  ( $4.1 \mu\text{molN L}^{-1}$ )、ペルー沖 OMZ の  $53 \mu\text{gN L}^{-1}$  ( $3.8 \mu\text{molN L}^{-1}$ ) よりもかなり高濃度であった。Meyer et al. (2005) によると、アナモックス細菌の活性は  $\text{NO}_2^-$  の濃度が制御している可能性が高い。したがって、今回算出した地中海のアナモックス活性が高い理由は、他の水域よりも  $\text{NO}_2^-$  が高濃度で蓄積する特殊な環境によるものだと考えられる。

## 培養実験

Fig. 3-9 には、アセチレン阻害法を用いた中海湖心の底層水の培養実験の検討結果を示した。培養開始 3 日目にアナモックス反応の中間体である  $\text{NH}_2\text{OH}$  と  $\text{N}_2\text{H}_4$  が増加したことから、アナモックス反応を確認できる。また、アセチレンを添加したことで、3 日目に  $\text{N}_2\text{O}$  も増加した。 $\text{N}_2\text{O}$  の増加量から脱窒による窒素除去量を算出でき、また、 $\text{N}_2\text{O}$  を含めた DIN の減少量からアナモックス反応による窒素除去量を推定することが可能である。今回の培養実験では、約 4 割がいわゆる脱窒によるもので、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。

地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。しかし、本研究により夏季に  $\text{NO}_2^-$  が蓄積する中海底層においてアナモックス反応による窒素除去も重要な役割を果たし、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ものと推察された。

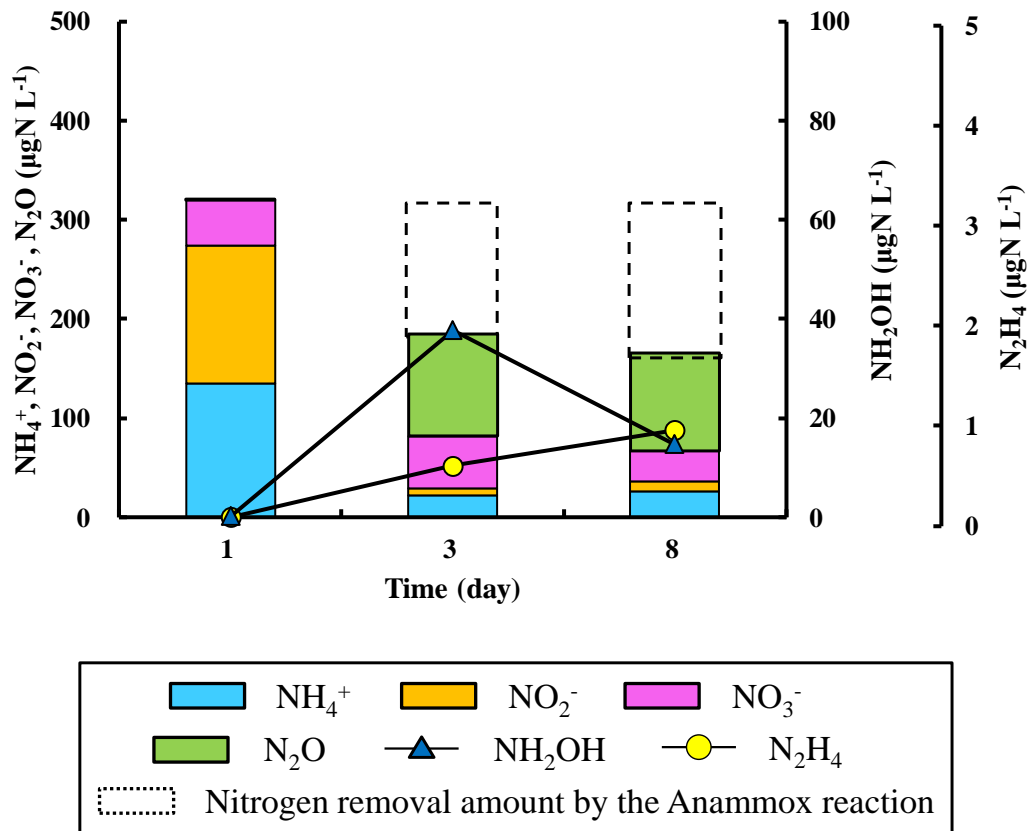


Fig. 3-9 Daily changes of dissolved inorganic nitrogen in the culture experiment.

## 結論

本研究では、我々の開発した  $\text{NH}_2\text{OH}$  及び  $\text{N}_2\text{H}_4$  の測定技術を用いて、汽水湖中海を対象にアナモックス反応について検討した。中海湖心 (Water depth: 7 m) の底層において、夏

季の  $\text{NO}_2^-$  蓄積時に  $\text{NH}_2\text{OH}$  及び  $\text{N}_2\text{H}_4$  が増加することを見出した (Figs. 3-4 and 3-6a<sub>3</sub>)。この有意な  $\text{N}_2\text{H}_4$  の検出により、先ずアナモックス反応が生じていることを確認できた。次に  $\text{NH}_2\text{OH}$  も同時に観測されたことに着目すると、本水域におけるアナモックスの反応プロセスは、Kartal et al. (2016)の発見した  $\text{NH}_4^+$  と  $\text{NO}$  から  $\text{N}_2\text{H}_4$  を形成するタイプ (Type-NO) ではなく、Oshiki et al. (2016)の発見した  $\text{NH}_4^+$  と  $\text{NH}_2\text{OH}$  から  $\text{N}_2\text{H}_4$  を形成するタイプ (Type- $\text{NH}_2\text{OH}$ ) によると判断された。今回、我々の試みた  $\text{NH}_2\text{OH}$  と  $\text{N}_2\text{H}_4$  の同時観測は、 $\text{NH}_4^+$  と  $\text{NH}_2\text{OH}$  から  $\text{N}_2\text{H}_4$  を形成するタイプ (Oshiki et al., 2016) のアナモックス反応の有無を定性的に判定するのに有効と考えられる。

また、8月における無機態窒素の鉛直分布では、 $\text{NO}_2^-$  は深度 4 m から蓄積し、5 m 以深で  $200 \mu\text{gN L}^{-1}$  ( $14.3 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) 程度蓄積していた (Fig. 4a<sub>3</sub>)。アナモックス反応の中間体である  $\text{NH}_2\text{OH}$  と  $\text{N}_2\text{H}_4$  も  $\text{NO}_2^-$  と同様に、4 m 以深で増加していたことから、夏季に地中海の深水層で活発なアナモックス反応が生じているものと考えられた。

一方、アセチレン阻害法を併用した嫌氣的培養実験では、地中海のアナモックス反応による窒素除去率は、一般的な脱窒よりも大きく、約 6 割という高い寄与率を示した。今後、 $^{15}\text{N}$  トレーサー法との比較検証を行う必要があるが、今回、現場の  $\text{NO}_3^-$  の生成速度 ( $1.7 \mu\text{gN L}^{-1} \text{d}^{-1}$ ) から見積もったアナモックス活性 (約  $20 \mu\text{gN L}^{-1} \text{d}^{-1}$ ) が、世界各地のアナモックス活性 ( $0.10 \sim 6.9 \mu\text{gN L}^{-1} \text{d}^{-1}$ ) よりもかなり高いことから、その妥当性が支持される。

中海湖心の底層は、潮汐により日本海からの新鮮な海水が流入し好氣的環境と嫌氣的環境を繰り返すことで、夏季に  $\text{NO}_2^-$  が蓄積する特性を持つ、世界的にも珍しい環境といえる。また、中海底層において、境水道入口付近から湖心にかけての広い範囲で  $\text{NO}_2^-$  が蓄積していることから (Fig. 3-8)、アナモックス反応は中海の窒素浄化において大きな役割を果たしているものと推察された。

## 総合考察

### 環境水中の $\text{NH}_2\text{OH}$ の定量法について

$\text{NH}_2\text{OH}$  の定量法として、前報の定量法 (Seike et al., 2004) の汽水・海水試料の妨害物質が  $\text{Br}^-$  であることを見出した。 $\text{Br}^-$  と次亜塩素酸が反応し  $\text{Br}_2$  が生成される。次に、 $\text{Br}_2$  と  $\text{NH}_2\text{OH}$  が反応し  $\text{HNO}_3$  となる。この反応メカニズムにより従来法の定量に妨害を生じたと考えられた。一方、 $\text{NH}_3$  の存在下では、 $\text{NH}_3$  が  $\text{Br}_2$  と反応して  $\text{NH}_2\text{Br}$  を形成し、次いでその  $\text{NH}_2\text{Br}$  が  $\text{Br}_2$  と反応して  $\text{N}_2\text{O}$  を形成することが示唆された。また  $\text{Br}_2$  が高濃度の場合、 $\text{Br}_2$  は  $\text{NHBr}_2$  と反応して  $\text{NHBr}_2$  を生成し、 $\text{NHBr}_2$  は  $\text{NH}_2\text{Br}$  と反応して  $\text{N}_2$  を生成する。この反応メカニズムにより妨害を生じたと考えられた。

そこで、フェノールが  $\text{Br}_2$  によって定量的に置換され、トリブロモフェノールを生成することに着目した。次亜塩素酸を添加する前にフェノール溶液を添加することによってその妨害を排除できることを明らかにし、汽水・海水試料にも定量を可能とした。これによって、定量下限が  $0.2 \mu\text{gN L}^{-1}$  であり、淡水から海水まで広い塩分範囲のサンプルに適用できるようになった。

$\text{N}_2\text{O}$  は、温暖化ガスとして知られ、京都議定書の削減対象ガスである。また、 $\text{N}_2\text{O}$  は温室効果だけでなくオゾン層破壊物質としての性質を持つ。 $\text{N}_2\text{O}$  の生成を理解するうえで重要となる物質が  $\text{NH}_2\text{OH}$  である。硝化と硝酸塩還元のプロセスにおける  $\text{NH}_2\text{OH}$  の生成を理解することは、 $\text{N}_2\text{O}$  の生成メカニズムの解明につながる。

アナモックスの反応プロセスは、Kartal et al. (2016) の発見した  $\text{NH}_4^+$  と  $\text{NO}$  から  $\text{N}_2\text{H}_4$  を形成するタイプ (Type-NO) のみではなく、Oshiki et al. (2016) の発見した  $\text{NH}_4^+$  と  $\text{NH}_2\text{OH}$  から  $\text{N}_2\text{H}_4$  を形成するタイプ (Type- $\text{NH}_2\text{OH}$ ) の存在も明らかになった。アナモックス反応の研究は、淡水のみでなく海水でも多く報告されているが、未だ不明な点も多い。前述したように、 $\text{NH}_2\text{OH}$  の現場観測は、Type- $\text{NH}_2\text{OH}$  のアナモックス反応の有無を定性的に判定す

るのに有効であり、今後、その必要性が高まるものと予想される。

### 環境水中のヒドラジンの定量法について

Sep-Pak C18 カートリッジを使用した固相抽出法を用いて、環境水中微量ヒドラジンの現場での簡単・迅速な濃縮および溶離による新規定量法を開発した。本法は、ヒドラジンを現場で *p*-ジメチルアミノベンズアルデヒド (*p*-DMAB) と反応させてアルダジンを生成させ、形成されたアルダジンを Sep-Pak C18 カートリッジを吸着させることで、非常に不安定なヒドラジンを安定な状態で現場から持ち帰ることを可能にした。アルダジンを吸着させた Sep-Pak C18 カートリッジを実験室に持ち帰り、塩酸-エタノール (1:10) 溶液を用いて溶離を行うことで、従来法と比較して 6.25 倍のアルダジンを濃縮することができる。さらに、生成したアルダジンを含む試料の通水量や塩酸-エタノール (1:10) 溶液の容量を変化させることで、濃縮倍率を変えることが可能である。これによって、定量範囲を 0.2 ~200  $\mu\text{gN L}^{-1}$  とすることができる。

本法は、Sep-Pak C18 カートリッジに生成したアルダジンを吸着捕集する。そのため、アルダジンと同様に吸着する有機物の影響を大きく受ける。また、6.25 倍の濃縮を行うため、環境水中の微量な有機物でも定量に影響を及ぼす。そこで、*p*-DMAB で発色させる前の濾過の段階において、Sep-Pak C18 カートリッジを用いてサンプル中の有機物を吸着・除去することで、淡水から海水までの広塩分範囲で、かつ排水のような汚水にも適用することを可能とした。

ヒドラジンは近年注目されているアナモックス反応の中間体として知られているが、これまで環境水中の微量なヒドラジンに適用可能な定量法はなかった。そのため、環境水中のヒドラジンの挙動は未解明な部分が多い。本法を用いることで、環境水中のヒドラジンの現場観測が可能となり、アナモックス反応の解明に繋がることが期待される。今後、本法の必要性が高まるものと予想される。

## アナモックス反応について

アナモックス活性は $^{15}\text{N}$ で標識した $\text{NH}_4^+$ と $\text{NO}_2^-$ のいずれかを試料水に添加して嫌気培養し、アナモックス反応によって生成する $^{14}\text{N}^{15}\text{N}$ ガスを定量することで求めることができる。しかし、環境水中の微弱なアナモックス活性を測定するためには、かなり洗練された実験環境と技術を要する。そこで本研究で開発した、アナモックス反応の中間体である $\text{NH}_2\text{OH}$ と $\text{N}_2\text{H}_4$ の環境水中の挙動からアナモックス反応を確認できないか検討を行った。調査対象とした中海湖心では、日本海からの新鮮な海水が流入することで好气的環境と嫌气的環境を繰り返しており、 $\text{NO}_2^-$ が蓄積する世界的にも珍しい環境だと分かった。また、 $\text{NO}_2^-$ 蓄積時にアナモックス反応の中間体である $\text{NH}_2\text{OH}$ 及び $\text{N}_2\text{H}_4$ が増加することから中海では活発なアナモックス反応が生じていることが分かった。今回、 $\text{NH}_2\text{OH}$ と $\text{N}_2\text{H}_4$ の環境水中の挙動を測定することで、現場のアナモックス反応の有無を知ることができた。我々の開発した $\text{NH}_2\text{OH}$ と $\text{N}_2\text{H}_4$ の定量法は、今後、アナモックス反応の動態解明に資するデータの蓄積に役立つものと考えられる。

また、 $^{15}\text{N}$ 同位体測定を利用しないアナモックス活性の測定方法として、アセチレン阻害法を併用した方法を考案した。アセチレン阻害法は、脱窒活性の測定によく使われており、脱窒における $\text{N}_2\text{O}$ から $\text{N}_2$ への還元を阻害し $\text{N}_2\text{O}$ を蓄積することを利用し、脱窒活性を求めるものである。したがって、培養後の $\text{N}_2\text{O}$ を測定することで、脱窒による窒素除去量を算出した。また、 $\text{N}_2\text{O}$ を含めたDINの減少量からアナモックス反応によって除去された窒素除去量を推算した。これによって、 $\text{N}_2\text{O}$ を含めたDINを測定することで $^{15}\text{N}$ 同位体測定を行わなくてもアナモックス活性を測定することができる。また、アセチレンは脱窒細菌以外に硝化細菌にも阻害を及ぼすことが知られており、アナモックス反応の培養を行う上で基質の $\text{NH}_4^+$ の硝化による減少を抑えることができる。このアセチレン阻害法を併用した嫌气的培養により、中海のアナモックス反応による窒素除去率は約6割という結果を得た。アナモックス活性の測定では、底層水における活性が低いことを考慮し、湖底堆積



物と底層水の混合試料を用いるのが一般的であり、底層水のみ活性を求めることは難しい。このアセチレン阻害法を併用した嫌氣的培養では、底層水のみのアナモックス活性を知ることが可能である。

本研究で提唱した、 $\text{NH}_2\text{OH}$  と  $\text{N}_2\text{H}_4$  の定量法、並びにアセチレン阻害法を併用した嫌氣的培養は、 $^{15}\text{N}$  同位体測定を用いたアナモックス反応の研究とは別の視点からアナモックス反応の評価を行うことができ、未解明な部分が多い環境水中のアナモックス反応の解明に役立つものとする。

## 第4章 摘要

近年、新たな窒素除去プロセスとしてアナモックス反応が提唱された。しかし、環境水中のアナモックス反応は未解明な部分が多い。そこで本研究では、アナモックス反応の中間体である  $\text{NH}_2\text{OH}$  と  $\text{N}_2\text{H}_4$  の定量法の開発を行い、島根県東部に位置する汽水湖中海に適用した。

### 次亜塩素酸塩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

汽水・海水中の微量ヒドロキシルアミン ( $\text{NH}_2\text{OH}$ ) の定量法を開発した。前報の方法は、淡水には適用できるが、汽水・海水試料には適用できなかった。本研究では、その妨害物質が海水成分の臭化物イオンにあることを明らかにし、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見出した。試料を 70 mL の褐色ガラスバイアル瓶に入れた。バイアル瓶に空気が入らないようにブチルゴムとアルミシールで密封した。次に、63.6 mM のフェノール溶液 1.0 mL と 3.5 mM の次亜塩素酸溶液 1.5 mL を順次添加し、 $\text{NH}_2\text{OH}$  を  $\text{N}_2\text{O}$  に酸化させた後、実験室に持ち帰り、ヘッドスペース法を用いて生成した  $\text{N}_2\text{O}$  を定量した。ヘッドスペースはマグナムシリンジを用い 99.9 % の純窒素を注入して作成した。数分間バイアル瓶を振り混ぜた後、ECD つきガスクロマトグラフで気相の  $\text{N}_2\text{O}$  を測定した。本法は、塩分のほか、アンモニウム塩や硝酸塩、そして  $300 \mu\text{gN L}^{-1}$  以下の亜硝酸塩の影響はない。本法の定量下限は、 $0.2 \mu\text{gN L}^{-1}$  であり、淡水から海水まで広い塩分範囲のサンプルの  $\text{NH}_2\text{OH}$  を定量することができる。本法を島根県東部に位置する汽水湖中海に適用し成果を得た。

## 現場固相抽出による環境水中の微量ヒドラジンの定量

環境水中のヒドラジンを *p*-ジメチルアミノベンズアルデヒド (*p*-DMBA) と反応させ、形成されたアルダジン化合物の濃度に基づいて測定する簡便な定量法を開発した。この方法では、Sep-Pak C18 カートリッジを用いた固相抽出法を利用し、分光光度法を用いてヒドラジンを定量した。環境水に *p*-DMBA 溶液を加え、ヒドラジンとの反応によりアルダジンを生成させた。Sep-Pak C18 カートリッジに通しアルダジンを吸着した。Sep-Pak C18 カートリッジに吸着したアルダジンを、塩酸・エタノール (1:10) 溶液を用いて溶離し、溶離液の吸光度 (457 nm) を測定した。本法は、既存の方法と比べて、6.25 倍の濃縮が可能であり、検出限界は  $0.2 \text{ mgN L}^{-1}$  であった。環境水中のヒドラジンの定量において、この方法は硫化水素と有機物の影響を受けないことがわかった。この方法を島根県東部の中海湖の汽水に適用したところ、下層においてヒドラジンが検出され、アナモックス反応の発現が示唆された。この方法を用いることで、淡水から海水および排水中のヒドラジンを測定することが可能になった。

## 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

近年の研究で、新しい窒素除去プロセスとして嫌氣的アンモニア酸化 (Anammox 反応) が発見された。しかし、アナモックス反応はその関心度の高さの反面、菌の培養条件や反応機構など、未解明な部分が多い。アナモックス反応の中間体としてヒドロキシルアミン ( $\text{NH}_2\text{OH}$ ) およびヒドラジン ( $\text{N}_2\text{H}_4$ ) を形成することが知られている。しかし、中間体という性質上不安定であり、定量法が確立していなかった。そこで、本研究において  $\text{NH}_2\text{OH}$

と  $\text{N}_2\text{H}_4$  の定量法を開発し、アナモックス反応の過程を理解するために中海で  $\text{NH}_2\text{OH}$  と  $\text{N}_2\text{H}_4$  の挙動を調べた。中海湖心では、日本海からの新鮮な海水が流入することで好氣的環境と嫌氣的環境を繰り返しており、中海では、 $\text{NO}_2^-$  が蓄積する時にアナモックス反応の中間体である  $\text{NH}_2\text{OH}$  及び  $\text{N}_2\text{H}_4$  が増加することからアナモックス反応が生じていることを立証した。また、アセチレン阻害法を併用した嫌氣的培養を行うことで、中海のアナモックス反応による窒素除去率は約 6 割という結果を得た。中海において、境水道付近から湖心までの広い範囲で  $\text{NO}_2^-$  が蓄積することから、アナモックス反応は中海の窒素浄化において大きな役割を果たしていることが推察された。

## Summery

In recent years, an Anammox reaction was proposed as a new nitrogen removal process. However, the Anammox reaction in environmental water has not been clarified yet. Therefore, in this study, I developed quantitative methods of  $\text{NH}_2\text{OH}$  and  $\text{N}_2\text{H}_4$  which are intermediates of Anammox reaction. It was applied to samples from Lake Nakaumi, a brackish lake located in the eastern part of Shimane Prefecture, Japan.

### **Sensitive method for the oxidation-determination of trace hydroxylamine in environmental water using hypochlorite followed by gas chromatography**

I developed a method for quantifying trace  $\text{NH}_2\text{OH}$  in brackish- and sea-water samples. Previously reported methods applicable to fresh water cannot be applied to such samples. We determined that interference in seawater owing to the bromide ion can be removed by addition of phenol. In our procedure, phenol and hypochlorite solutions were added to a sample solution to oxidize  $\text{NH}_2\text{OH}$  to  $\text{N}_2\text{O}$ .  $\text{N}_2\text{O}$  in the sample was then quantified by headspace analysis. The method is not affected by the salt content or ammonia, nitrate, or nitrite at concentrations of  $300 \mu\text{gN L}^{-1}$  or less. It has a limit of detection of  $0.2 \mu\text{gN L}^{-1}$ , and can quantify  $\text{NH}_2\text{OH}$  in fresh- and sea-water samples with a wide range of salinity. It was applied to samples from Lake Nakaumi, a brackish lake located in the eastern part of Shimane Prefecture, Japan.

## **Determination of Trace Hydrazine in Environmental Water Samples by *in situ* Solid Phase**

### **Extraction**

A simple and rapid *in situ* method for the determination of hydrazine based on the concentration of aldazine compound formed by the reaction of hydrazine with *p*-dimethylaminobenzaldehyde, was developed. This method was based on the solid-phase extraction using a Sep-Pak C18 cartridge, followed by the quantification of hydrazine using a spectrophotometric method. To a sample solution of environmental water, *p*-dimethylaminobenzaldehyde solution was added to form aldazine by the reaction with hydrazine. The solution was passed through a Sep-Pak C18 cartridge for the adsorption of aldazine. In the laboratory, the aldazine adsorbed on the Sep-Pak C18 cartridge was eluted by passing a hydrochloric acid–ethanol (1:10) solution through the cartridge, and the color intensity of the solution was measured as 457 nm. The limit of detection for the new method was 0.2 mgN L<sup>-1</sup> of hydrazine. The determination of hydrazine in solution was not influenced even by hydrogen sulfide and organic matter. This method was then applied to the brackish water of Lake Nakaumi in the eastern area of Shimane Prefecture, Japan. This method was used to determine of hydrazine in freshwater, sea water and waste water.

### **Contribution of Anammox reaction to nitrogen purification in brackish lake Nakaumi**

Recent studies suggested that anaerobic ammonium oxidation (Anammox) found as a new nitrogen removal process forms hydroxylamine (NH<sub>2</sub>OH) and hydrazine (N<sub>2</sub>H<sub>4</sub>) as intermediates of the reaction. But the Anammox reaction is not well known in details. In this study, I investigated

behavior of  $\text{NH}_2\text{OH}$  and  $\text{N}_2\text{H}_4$  in Lake Nakaumi to understand the Anammox process. I found out that  $\text{NH}_2\text{OH}$  and  $\text{N}_2\text{H}_4$  were produced by Anammox process in Lake Nakaumi. Moreover, from the results of incubation experiment, it was suggested that the ratio of nitrogen removal by the Anammox reaction was about 60% in the bottom water of Lake Nakaumi.

## 引用文献

Amano, T, I Yoshinaga, T Yamagishi, CV Thuoc, PT Thu, S Ueda, K Kato, Y Sako, and Y Suwa, (2011) Contribution of anammox bacteria to benthic nitrogen cycling in a mangrove forest and shrimp ponds, Haiphong, Vietnam. *Microbes Environ*, 26, 1–6.

Amlathe S. and V. K. Gupta (1990) Some observations on a field procedure for sampling and determination of low concentrations of hydrazine in air. *Microchem. J.*, 42, 331-335.

Anderson J. H. (1964) The copper-catalysed oxidation of hydroxylamine. *Analyst*, 89, 357-362.

Astrid. A. van de Greef, P, de Bruijn P., Robertson L.A., Jetten M.S.M., and Kuenen J.G., (1997) Metabolic pathway of anaerobic ammonium oxidation on the basis of  $^{15}\text{N}$  studies in a fluidized bed reactor. *Microbiology*, 143, 2415-2421.

Bendschneider K. and RJ Robinson (1952) A new spectrophotometric method for the determination of nitrite in sea water. *J. Mar. Res.*, 11, 87-96.

Burrell P. C., Keller J. and Blackall L. L. (1998) Microbiology of a nitrite-oxidizing bioreactor, *Environ, Microbiol.* 64, 1878-1883.

Csaky T. Z. (1949) On the Estimation of Bound Hydroxylamine in Biological Materials. *Acta Chem. Scand.*, 2, 450-454.



- Caranto, J. D. and Lancaster, K. M. (2017) Nitric oxide is an obligate bacterial nitrification intermediate produced by hydroxylamine oxidoreductase. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 114, 8217–8222.
- Daims H., Lebedeva E.V., Pjevac P., Han P., Herbold C., Albertsen M., Jehmlich N., Palatinszky M., Vierheilig J., Bulaev A., Kirkegaard R.H., von Bergen M., Rattei T., Bendinger B., Nielsen P.H., and Wagner M., (2015) Complete nitrification by *Nitrospira* bacteria. *Nature* 528, 504–509.
- Dale O. R., Tobias C. R., and Song B.,(2009) Biogeographical distribution of diverse anaerobic ammonium oxidizing (anammox) bacteria in Cape Fear River Estuary. *Environmental Microbiology*, 11, 1194–1207.
- Dalsgaard, T. , Canfield, D. E. , Petersen, J. , Thamdrup, B. and Acuria-Gonzales, J. (2003) N<sub>2</sub> production by the anammox reaction in the anoxic water column of Golfo Dulce , Costa Rica. *Nature*, 422, 606-608.
- Dalsgaard T, Thamdrup B, Canfield DE. (2005) Anaerobic ammonium oxidation (anammox) in the marine environment. *Res. Microbiol.* 156, 457–464
- Endres G. and L. Kaufmann (1937) Die Bestimmung kleinster Mengen von Hydroxylamin, Nitrit und Nitrat. *Ann. Chem.*, 530, 184-194.
- Fiadeiro M., L. Solorzano, and J. D. H. Strickland (1967) Hydroxylamine in seawater. *Limnol. Oceanogr.*, 12, 555-556.

Fogg A. G., A. Y. Chamsi, A. A. Barros, and J. O. Cabral (1984) Flow injection voltammetric determination of hypochlorite and hypobromite as bromine by injection into an acidic bromide eluent and the indirect determination of ammonia and hydrazine by reaction with an excess of hypobromite. *Analyst*, 109, 901-904.

Furukawa K. (2004) Discovery of Anaerobic Ammonium Oxidation (Anammox) and Subsequent Trends in Reserch. *Journal of Japan Society on Water Environment*, 27, 442-447.

福岡 捷二, 黒川 岳司, 日比野 忠史, 鈴木 篤, 中村 剛, 上原 浩 (1999) 中海における気象変化に伴う流れと貧酸素水塊の挙動. *土木学会論文集*, No. 636, 61-79.

福岡 捷二, 上原 浩, 黒川 岳司, 鈴木 篤, 肥田 幸子 (2000) 台風通過に伴う中海の水位変動とそれが中海の水環境に及ぼす影響. *水工学論文集*, 44, 1185-1190.

福森 亮子, 千賀 有希子, 奥村 稔, 藤永 薫, 清家 泰 (2003) 固相抽出法による環境水中ヒドロキシルアミンの前処理及び前濃縮/吸光光度定量法. *分析化学*, 52, 747-753.

Gao D., Wang X., Liang H., Wei Q., Dou Y. and Li L. (2018). Anaerobic ammonia oxidizing bacteria: ecological distribution, metabolism, and microbial interactions. *Front. Environ. Sci. Eng.*, 12, 10.

Griffin, B. M., Schott, J. and Schink, B. (2007) Nitrite, an electron donor for anoxygenic photosynthesis. *Science*, 316, 1870–1870.

- Hamasaki K, Shishikura R, Suzuki S, Shiozaki T, Ogawa H, Nakamura T, Suwa Y, (2018) Distribution and phylogeny of anaerobic ammonium-oxidizing (anammox) bacteria in the water column of the central Pacific Ocean. *Deep-Sea Res Pt II*, 156, 60–67.
- Hamersley M. R., Woebken D., Boehrer B., Schultze M., Lavik G., and Kuypers M. M., (2009) Water column anammox and denitrification in a temperate permanently stratified lake (Lake Rassnitzer, Germany). *Systematic and Applied Microbiology*, 32, 571–582.
- Hofman T. and H. Lees (1952) The biochemistry of the nitrifying organisms. 4. The respiration and intermediary metabolism of *Nitrosomonas*. *Biochem. J.*, 54, 579-583.
- Hou L. J., Zheng Y. L., Liu M., Gong J., Zhang X. L., Yin G. Y., and You L., (2013) Anaerobic ammonium oxidation (anammox) bacterial diversity, abundance, and activity in marsh sediments of the Yangtze Estuary. *Journal of Geophysical Research. Biogeosciences*, 118, 1237-1246.
- JIS B 8824 (2005) *p*-ジメチルアミノベンズアルデヒド吸光光度法. ボイラの供給水及びボイラ水-試験方法, 74-75, 日本規格協会, 東京.
- Kalvelage T., Jensen M.M., Contreras S., Revsbech N. P., Lam P., Gunter M., LaRoche J., Lavok G., and Kuypers M.M.M., (2011) Oxygen sensitivity of Anammox and coupled N-cycle processes in oxygen minimum zones. *PLoS ONE*, 6, 1-12.

Kartal, B. and Keltjens, J. T. (2016) Anammox biochemistry: a tale of heme c proteins. Trends Biochem. Sci. 41, 998–101.

Kartal B., Maalcke W.J., de Almeida N.M., Cirpus I., Gloerich J., Geerts W., Op den Camp H.J., Harhangi H.R., Janssen-Megens E.M., Francoijs K.J., Stunnenberg H.G., Keltjens J.T., Jetten M.S., and Strous M., (2011) Molecular mechanism of anaerobic ammonium oxidation. Nature 479, 127–130.

Kato T, Sugahara S, Kajitani T, Senga Y, Egawa M, Kamiya H, and Seike Y (2017) Determination of Trace Hydrazine in Environmental Water Samples by *in situ* Solid Phase Extraction. Analytical Sciences, 33, 487-491.

Kato T, Sugahara S, Murakami M, Senga Y, Egawa M, Kamiya H, Omata K, and Seike Y (2017) Sensitive Method for the Oxidation-determination of Trace Hydroxylamine in Environmental Water Using Hypochlorite Followed by Gas Chromatography. Analytical Sciences, 33, 691-695.

Kaveeshwar R. and V. K. Gupta, Fresenius J. (1992) A new spectrophotometric method for the determination of hydrazine in environmental samples. Anal. Chem., 344, 114-117.

Kessel M. A. H. J. Van, D. R. Speth, M. Albertsen, P. H. Nielsen, H. J. M. Op den Camp, B. Kartal, M. S. M. Jetten, S. Lucker, (2015) Complete nitrification by a single microorganism. Nature, 528, 555-559.

- Kobayashi, K., Makabe, A., Yano, M., Oshiki, M., Kandaichi, T., Casciotti, K. L., et al. (2019). Dual nitrogen and oxygen isotope fractionation during anaerobic ammonium oxidation by anammox bacteria. *ISME J.* 13, 2426–2436.
- Koch, G. , Egili, K. , van der Meer, J. R. and Siegrisy, H. (2000) Mathematical modeling of autotrophic denitrification in a nitrifying biofilm of a rotating biological contactor, *Wat. Sci. Technol.*, 41, 191-198.
- Kuypers M.M.M., Marchant H.K., and Kartal B., (2018) The microbial nitrogen-cycling network. *Nat Rev Microbiol*, 16, 263–276.
- Kuypers M.M.M, Sliemers A.O., Lavic G., Schmid M., Jørgensen B.B., Kuenen J.G., Damste J.S.S., Strous M., and Jetten M.S.M., (2003) Anaerobic ammonium oxidation by anammox bacteria in the Black Sea. *Nature*, 422, 608-611.
- Laanboek H. and Woldendorp J. W. (1995) Activity of chemolithotrophic nitrifying bacteria under stress in natural solid, *Microbial Ecol.* 14, 275-304.
- Li, M., Cao, H., Hong, Y.G., and Gu, J.D. (2011) Seasonal dynamics of anammox bacteria in estuarial sediment of the Mai Po Nature Reserve revealed by analyzing the 16S rRNA and hydrazine oxidoreductase (*hzo*) genes. *Microbes Environ*, 26, 15–22.

- Liu Y. Y., I. Schmeltz, and D. Hoffmann (1974) Chemical studies on tobacco smoke. Quantitative analysis of hydrazine in tobacco and cigarette smoke. *Anal. Chem.*, 46, 885-889.
- Lotti T., R. Kleerebezem, C. van Erp Taalman Kip, T.L.G. Hendrickx, J. Kruit, M. Hoekstra, M.C.M. van Loosdrecht, (2014) Anammox growth on pretreated municipal wastewater *Environ. Sci. Technol.*, 48, 7874-7880.
- Marcel, M. M. K. , Sillekers, A. O. , Lavik G. , Schmid, Jorgensen, B. B. , Kuenen, J. G. , Damste, J. S. S. , Strous M. and Jetten, M. S. M. (2003) Anaerobic ammonium oxidation by anammox bacteria in the Black Sea, *Nature*, 422, 608-611.
- Meyer R.L., Risgaard-Petersen N., Allen D.E., (2005) Correlation between anammox activity and microscale distribution of nitrite in a subtropical mangrove sediment. *Appl Environ Microbiol* 71, 6142–6149.
- Mulder, A., Van de Graaf, A. A., Robetson, K. A. and Kuenen, J. G. (1995) Anaerobic ammonium oxidation discovered in a denitrifying fluidized bed reactor, *Microbiology ecology*, 16, 177-184.
- Nicholls, J.C., and Trimmer, M. (2009) Widespread occurrence of the anammox reaction in estuarine sediments. *Aquat Microb Ecol*, 55, 105–113.
- Novak R. and P. W. Wilson (1948) The Utilization of Nitrogen in Hydroxylamine and Oximes by *Azotobacter vinelandii*. *J. Bact.*, 55, 517-524.

Oshiki M., Ali M., Shinyako-Hata K., Satoh H. and Okabe S., (2016) Hydroxylamine-dependent anaerobic ammonium oxidation (anammox) by 'Candidatus Brocadia sinica'. *Environ. Microbiol.* 18, 3133–3143.

Ohtake, H., Kato S., and Date Y., 1984. The role of tides in removing phosphorus from Lake Nakaumi, a coastal lagoon in Japan. *Archiv für Hydrobiologie* 99, 443-462.

Okumura M, S. Honda, K. Hujinaga, and Y. Seike (2005) A simple and rapid in situ preconcentration method for trace ammonia nitrogen in environmental water samples using a solid-phase extraction followed by spectrophotometric determination. *Anal. Sci.*, 21, 1137-1140.

Okumura M, T. Anate, K. Hujinaga, and Y. Seike (2002) A simple and rapid in situ preconcentration method using solid-phase extraction for the determination of dissolved manganese in brackish lake water samples. *Anal. Sci.*, 18, 1093-1097.

Okumura M, Y. Seike, K. Hujinaga, and K. Hirao (1997) In situ preconcentration method for iron(II) in environmental water samples using solid phase extraction followed by spectrophotometric determination. *Anal. Sci.*, 13, 231-235.

Okumura M., N. Yano, K. Hujinaga, Y. Seike, and S. Matsuo (1999) In situ preconcentration method for trace dissolved sulfide in environmental water samples using solid-phase extraction followed by spectrophotometric determination. *Anal. Sci.*, 15, 427-431.

奥村 稔, 藤永 薫, 清家 泰 (2005) 環境水中微量化学種の捕集濃縮のための現場固相抽出法の設計とその水環境におけるスペシエーションへの展開. 分析化学, 54, 1061-1073.

Pittwell L. R. (1975) “Mikrochimica Acta [Wien] 1975 II” , Springer-Verlag Press.

Rao K. B. and G. G. Z. Rao (1957) Studies in ferrimetry Part II Determination of hydroxylamine - Use of copper sulphate as catalyst Z. Anal. Chem., 157, 100.

Ravishankara A. R., John S. Daniel, Robert W. Portmann (2009) Nitrous Oxide (N<sub>2</sub>O) : The Dominant Ozone-depleting Substance Emitted in the 21st Century. Science., 326: 123-125.

Rich, J.J., Dale, O.R., Song, B., and Ward, B.B. (2008) Anaerobic ammonium oxidation (anammox) in Chesapeake Bay sediments. Microb Ecol, 55, 311–320.

Riley J. P. and G. Skirrows (1965) “*Chemical Oceanography*”, p.648, Academic Press, New York.

Risgaard-Petersen, N., Meyer, R.L., Schmid, M., Jetten, M.S.M., Enrich-Prast, A., Rysgaard, S., and Revsbech, N.P. (2004) Anaerobic ammonium oxidation in an estuarine sediment. Aquat Microb Ecol, 36, 293–304.



Roth M. and J. Rieder (1962) Spektrofluorometrische bestimmung von hydrazinen und deren anwendung zur quantitativen bestimmung von benzyldiazin in biologischen proben. Anal. Chim. Acta, 27, 20-26.

Sagi T. (1966) Determination of ammonia in sea water by the indophenol method and its application to the coastal and off-shore waters. Oceanogr. Mag., 18, 43-51.

Seike Y., H. Oka, O. Mitamura, M. Okumura, K. Fujinaga, and Y. Senga (2000) A pretreatment method for the determination of nitrate in brackish water and seawater based on the hydrazinium reduction technique. Limnology, 2000, 1, 129-132.

Seike Y., K. Kondo, H. Hashitani, M. Okumura, K. Fujinaga, and Y. Date (1990) Nitrogen metabolism in the brackish Lake Nakanoumi. IV. Seasonal variation of nitrate nitrogen. Jpn. J. Limnol., 1990, 51, 137-147.

Seike Y., R. Fukumori, Y. Senga, H. Oka, K. Fujinaga, and M. Okumura (2004) A Simple and Sensitive Method for the Determination of Hydroxylamine in Fresh-Water Samples Using Hypochlorite Followed by Gas Chromatography. Anal. Sci., 20, 139-142.

清家 泰, 奥村 稔, 藤永 薫, 黒住 誠司 (1997) 汽水湖中海における貧酸素水塊形成時の硝化・脱窒. 沿岸海洋研究, 35, 27-33.

Senga Y., K. Mochida, N. Okamoto, R. Fukumori, and Y. Seike (2002) Nitrous oxide in Lake Nakaumi, Japan, II: The role of nitrification and denitrification for N<sub>2</sub>O accumulation. *Limnology*, 3, 21-27.

Senga Y., Y. Seike, K. Mochida, K. Fujinaga, and M. Okumura (2001) Nitrous oxide in Lakes Shinji and Nakaumi, Japan. *Limnology*, 2, 129-136.

Straus, M. , Fuerst, J. A. , Kramer, E. H. M. , Logemann, S. M. , Muyzer, G. , van de Pas-Schoonen, K. T. , Webb, R. , Kuenen, J. G. and Jetten, M. (1999) Missing lithotroph identified as a new planctomycete, *Nature*, 400, 446-449.

Senga Y, Mochida K, Fukumori R, Okamoto N, and Seike Y (2006) N<sub>2</sub>O accumulation in estuarine and coastal sediments: The influence of H<sub>2</sub>S on dissimilatory nitrate reduction. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 67, 231-238.

Senga Y, Okumura M, and Seike Y (2010) Seasonal and Spatial Variation in the Denitrifying Activity in Estuarine and Lagoonal Sediments. *E Journal of Oceanography*, 66, 155-160.

Tal, Y., Watts, J.E.M., and Schreier, H.J. (2005) Anaerobic ammonia-oxidizing bacteria and related activity in Baltimore inner Harbor sediment. *Appl Environ Microbiol*, 71, 1816–1821.

Tanaka M. (1953) Occurrence of Hydroxylamine in Lake Waters as an Intermediate in Bacterial Reduction of Nitrate. *Nature*, 171, 1160-1161.

Trimmer, M., Nicholls, J.C., and Deflandre, B. (2003) Anaerobic ammonium oxidation measured in sediments along the Thames estuary, United Kingdom. *Appl Environ Microbiol*, 69, 6447–6454.

Teixeira, C., Magalhaes, C., Joye, S.B., and Bordalo, A.A. (2012) Potential rates and environmental controls of anaerobic ammonium oxidation in estuarine sediments. *Aquat Microb Ecol*, 66, 23–32.

Verma K. K., A. Srivastava, J. Ahmed, and S. Bose (1979) Titrimetric determination of some organic compounds with bromine chloride. *Talanta*, 25, 469-475.

Wang J. and Z. Taha (1988) Catalytic-adsorptive stripping voltammetric measurements of hydrazines. *Talanta*, 35, 965-968.

Weiss R. F. and B. A. Price (1980) Nitrous oxide solubility in water and seawater. *Mar. Chem.*, 8, 347-359.

Wood, E. D. Armstrong, F. A. J. and Richards, F. A. (1967) Determination of nitrate in sea water by cadmium-copper reduction to nitrite. *J. Mar. Biol. Ass. U.K.*, 47, 23-31.

Yoshinari, T., R. Hynes and R. Knowles (1997) Acetylene inhibition of nitrous oxide reduction and measurement of Denitrification and nitrogen fixation in soil. *Soil. Biol. Biochem.*, 9, 177-183.

## 論文目録

### 学術論文

(a)論文題目 : Determination of Trace Hydrazine in Environmental Water Samples by in situ Solid

Phase Extraction

共著者名 : Toshikuni KATO, Shogo SUGAHARA, Takahiro KAJITANI, Yukiko SENG,  
Michiko EGAWA, Hiroshi KAMIYA, Yasushi SEIKE

掲載雑誌 : Analytical Sciences

発行年月 : 2017 年 4 月

(b)論文題目 : Sensitive method for the oxidation-determination of trace hydroxylamine in  
environmental water using hypochlorite followed by gas chromatography

共著者名 : Toshikuni KATO, Shogo SUGAHARA, Makoto MURAKAMI, Yukiko SENG,  
Michiko EGAWA, Hiroshi KAMIYA, Kohji OMATA, Yasushi SEIKE

掲載雑誌 : Analytical Sciences

発行年月 : 2017 年 6 月

## 謝辞

本研究の遂行にあたり、御懇篤なご指摘を頂いた島根大学教授清家泰先生ならびに島根大学教授小俣光司先生、助教管原庄吾先生、助手江川美千子先生に厚くお礼申し上げます。

本研究の遂行に際してご協力とご助言を賜った島根県保健環境科学研究所 神谷宏部長に感謝と御礼を申し上げます。

本研究の遂行において、ご支援とご助言を頂いた東京大学大学院新領域創成科学研究科 山室真澄教授には深く感謝いたします。

最後に、研究を続けるにあたって精神面で大きな支えとなっていたいただいた研究室の先輩を始め、家族、心優しい親友達に心から感謝いたします。