

氏名	引野 愛子		
学位の種類	博士 (理学)		
学位記番号	総博甲第 150 号		
学位授与年月日	令和 4 年 3 月 1 8 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 749 号		
専攻名	総合理工学専攻		
学位論文題目	ダム湖表層におけるヒドロキシルアミンの生成に関する研究 (Generation of hydroxylamine in epilimnion of dam lake)		
論文審査委員	主査	島根大学教授	田中 秀和
		島根大学教授	小俣 光司
		島根大学教授	半田 真
		島根大学教授	大谷 修司
		島根大学講師	管原 庄吾

論文内容の要旨

水圏において、 NH_4^+ 、 NO_2^- 、 NO_3^- 、 NH_2OH および N_2O のような窒素化学種はバクテリアによって利用され循環している。湖沼において、プランクトンやその他の生物の遺骸、流入河川や降雨などの湖沼外から流入した懸濁物に含まれる有機態窒素は、バクテリアによってアミノ酸・尿素などの溶存有機態窒素を経て NH_4^+ に分解される。 NH_4^+ はアンモニア酸化細菌や亜硝酸酸化細菌により酸化され中間体として NH_2OH や NO_2^- を経て NO_3^- になる (硝化反応)。硝化反応は一般に、溶存酸素がないと進行しないことや光によって硝化細菌の活性を失うことが知られている。また、 NO_3^- は溶存酸素がほとんどなくなると、脱窒細菌により還元され、中間体として亜酸化窒素 (N_2O) を経て分子状窒素 (N_2) になる (脱窒反応)。さらに、新たな窒素除去プロセスである Anammox 反応が提唱された。Anammox 反応は NH_4^+ と NO_2^- 由来の NH_2OH から中間体として N_2H_4 を経て N_2 ガスを生成する反応である。このように、窒素化学種は環境水中で微生物等により様々な形で利用され循環しており、環境水中の窒素化学種の挙動を把握することは非常に重要である。

第 1 章では、島根県の東部に位置し、夏季にアオコの発生が毎年確認される布部ダムにおいて、フィールド調査により窒素化学種の挙動を調査した。近年、海洋において、鉄の欠乏による植物プランクトンの増殖阻害が報告された (Glover, 1977; Greene R. M. et al., 1991)。それ以降、海洋の亜表層において亜硝酸塩の極大層が形成されるという現象が観測され (Lomas M. W. et al., 2006; 武田, 2016)、この原因が、鉄の欠乏に伴う植物プランクトンの硝酸塩代謝の阻害作用による亜硝酸塩の細胞外への放出にあることが報告されている (武田, 2016) が、植物プランクトンの窒素代謝により亜硝酸塩以外のものが生成・放出されるという報告はない。

しかしながら本研究において、布部ダムの表層水 (深度: 0 m および 1 m) で高濃度の NH_2OH が検出されるという現象を見出した。前述したように、 NH_2OH は一般に、硝化反応や Anammox

反応の中間体として生成されることが知られている。しかしながら表層において、これらの反応は光や酸素の影響を受けるため、硝化反応や Anammox 反応が起きる可能性は低い。さらに、 NH_2OH は植物プランクトンの指標となる Chl-a と良好な正の相関 ($R=0.70$, $p<0.01$) があることが分かった。また、無菌ではないものの *Microcystis* sp.を用いた培養実験において NH_2OH の増加が確認された。この結果より、夏季において表層水で検出される NH_2OH は、硝化反応や Anammox 反応によるものではなく、植物プランクトンに由来する可能性が示唆された。

第2章では、 Fe^{3+} を酸化剤として使用した NH_2OH の定量法の改良を行った。既存の NH_2OH の定量法である Seike et al. (2004) や Kato et al. (2017) は、酸化剤として次亜塩素酸ナトリウム溶液を用いて NH_2OH を N_2O に酸化し、 N_2O を ECD-GC で測定する定量方法である。特に Kato et al. (2017) の方法は、淡水、汽水及び海水サンプルに適用可能であり、いずれも高い回収率と再現性を有する高感度定量法 (定量下限: $0.2 \mu\text{gNL}^{-1}$) である。しかしながら、酸化剤として使用している次亜塩素酸ナトリウム溶液の酸化力が強いため、植物プランクトンのような有機物を多く含む試料に適用する場合、特にアオコや赤潮などの植物プランクトンの異常増殖が発生した水域で適用する際には、有機物の分解に次亜塩素酸が消費され、酸化剤が不足することで過小評価されることが懸念された。そこで、次亜塩素酸ナトリウム溶液よりも酸化力の低い Fe^{3+} を酸化剤として使用した NH_2OH の定量法の開発を行った。本法は、既存の NH_2OH の定量法と同様に淡水、汽水及び海水サンプルにおいて高感度での定量が可能であり、加えて酸化剤として次亜塩素酸を使用する方法とは異なり、 Fe^{3+} は有機物による影響を受けないため、アオコや赤潮などの植物プランクトンの異常増殖が発生した水域でも適用が可能となった。

第3章では、第1章において夏季に表層水において検出される NH_2OH が、植物プランクトンに由来する可能性が示唆されたことから、表層の NH_2OH に注目し、植物プランクトンのような有機物を多く含む水域でも適用可能な Fe^{3+} を用いた NH_2OH の定量法を使用して、島根県の中部に位置する三瓶ダムにおいて、夏季の NH_2OH の鉛直分布及び植物プランクトンの出現種の把握を目的に、フィールド調査を行った。その結果、第1章の布部ダムと同様にダム湖表層水において、夏季に高濃度の NH_2OH と Chl-a が観測され、さらにラン藻が出現し優占していたことがわかった。そこで、植物プランクトンの特にラン藻が NH_2OH を生成するかどうか検討するため、三瓶ダムで採取した植物プランクトン (ラン藻: *Dolichospermum crassum*) の無菌化した単離培養株を用いて室内培養実験を行った。その結果、 NH_2OH の増加が確認された。また、培養期間中は無菌状態が維持されたことは確認できているため、硝化反応や Anammox 反応の影響は排除できることから、これによりラン藻 *Dolichospermum crassum* による NH_2OH の生成・放出が明らかになった。以上の結果より、夏季におけるアオコ発生時の表層水で高濃度で検出される NH_2OH は、ラン藻により生成・放出されたものであることが示され、植物プランクトンによる未解明の窒素代謝プロセスの存在を見出した。

論文審査結果の要旨

本論文は、水圏における微生物的窒素サイクルを把握することを目的に、ダム湖の表層で多量に発生するヒドロキシルアミン (NH_2OH) に注目し、フィールド実験と室内実験により、その鉛直分布、植物プランクトンとの関連、高精度分析法の開発、新たな窒素代謝プロセスの解明についての研究を纏めたものであり、6章からなっている。

第1章は序論で、概略紹介として本研究の背景・意義・目的 (水圏における微生物的窒素サイクル、ヒドロキシルアミンの生成プロセスとその植物プランクトンとの関連など) が述べられている。

第2章は、島根県東部に位置し、夏季にはアオコの発生が毎年確認される布部ダムにおいて、フィールド調査により窒素化学種の挙動を調査した結果を纏めている。近年、海洋において、鉄の欠乏による植物プランクトンの増殖阻害が報告された。それ以降、海洋の垂表層において亜硝酸塩の極大層が形成されるという現象が観測され、この原因が鉄の欠乏に伴う植物プランクトンの硝酸塩代謝の阻害作用による亜硝酸塩の細胞外への放出にあることが報告されているが、植物プランクトンの窒素代謝により亜硝酸塩以外のものが生成・放出されるという報告はない。一方、本研究では、布部ダムの表層水で高濃度の NH_2OH が検出されるという現象を見出した。 NH_2OH は一般的に、硝化反応や硝酸還元反応、Anammox 反応の中間体として生成されることが知られている。しかし、表層において、これらの反応は光や酸素の影響を受けるため、硝化反応や硝酸還元反応、Anammox 反応が起きる可能性は低い。さらに、 NH_2OH は植物プランクトンの指標となるクロロフィル a と良好な正の相関があることが分かった。この結果より、夏季において表層水で検出される NH_2OH は、硝化反応や硝酸還元反応、Anammox 反応によるものではなく、植物プランクトンに由来する可能性を示唆している。

第3章は、 Fe^{3+} を酸化剤として使用した新たな NH_2OH の高精度定量法の開発について纏めている。既存の NH_2OH 定量法は、次亜塩素酸ナトリウム溶液を用いて NH_2OH を N_2O に酸化し、 N_2O を ECD-GC で測定する。この方法は、淡水、汽水および海水試料に適用可能であり、いずれも高い回収率と再現性を有する高感度定量法である。しかし、次亜塩素酸ナトリウムは高い酸化力をもつため、植物プランクトンのような有機物を多く含む試料水に適用する場合、とくにアオコや赤潮などの植物プランクトンの異常増殖が発生した水域で適用する際には、有機物の分解に次亜塩素酸が優先消費され、 NH_2OH の酸化が不十分になることで、定量値が過小評価されることが懸念された。そこで本研究では、次亜塩素酸ナトリウム溶液よりも酸化力の低い Fe^{3+} を酸化剤として使用した NH_2OH の定量法の開発と最適化を行った。本法は、従来法と同様に淡水、汽水および海水サンプルにおいて高精度での定量が可能であり、さらにアオコや赤潮などの植物プランクトンの異常増殖が発生した水域でも適用が可能であることを見いだした。

第4章では、開発した NH_2OH 定量法を用い、島根県中部に位置する三瓶ダムにおいて、夏季の NH_2OH の鉛直分布と植物プランクトンの出現種の把握を目的に、フィールド調査を行った結果を纏めたものである。布部ダムと同様にダム湖表層水において、夏季に高濃度の NH_2OH とクロロフィル a が観測され、さらにラン藻が出現、優占していた。そこで、植物プランクトンのとくにラン藻が NH_2OH を生成するか検討するため、採取した植物プランクトンの一種であるラン藻 *Dolichospermum crassum* を無菌化した単離培養株を用いて室内培養実験で NH_2OH の生成を確認した。その結果、培養時間とともに NH_2OH 生成量の増加が確認された。培養期間中は無菌状態が維持されたことは確認できているため、硝化反応や硝酸還元反応、Anammox 反応の影響はなく、これによりラン藻 *Dolichospermum crassum* による NH_2OH の生成・放出が明らかになった。以上の結果より、夏季におけるアオコ発生時の表層水で検出される高濃度 NH_2OH は、ラン藻により生成・放出されたものであることが明らかとなり、植物プランクトンによる新たな窒素代謝プロセスの存在を見出した。

第5章は、本論文の総合考察と今後の展望について述べられている。

第6章は、2章～4章の摘要を記している。

以上のように、本論文は、ダム湖表層において生成する高濃度の NH_2OH に注目し、その鉛直分布、植物プランクトンとの関連、高精度分析法の開発、ラン藻を用いた培養実験による新たな窒素代謝プロセスの提案などの研究成果を纏めたもので、非常にオリジナリティーが高く、十分な価値がある研究結果が含まれており、分析化学と陸水学およびそれらの融合分野における学術貢献度が極めて高いと判断された。また、得られた成果は、申請者を筆頭著者とした2編の関連論文(査読付き学術雑誌)に掲載されている。これらのことから、本博士論文は非常に優れたものと評価され、博士(理学)の学位授与に値する内容であると審査委員会全員一致で判定した。