

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

引野 愛子

目次

第1章 序章	1
第2章 布部ダム表層における NH_2OH の由来の検討	7
第3章 Fe^{3+} を用いた NH_2OH の定量法の改良	26
第4章 三瓶ダム表層における NH_2OH の発生及び植物プランクトンに由来する NH_2OH の生成・放出	45
第5章 総合考察	63
第6章 摘要	66
参考文献	72
論文目録	81
謝辞	82

第1章 序章

窒素は地球上の全ての生物の必須元素であり、生物生産を制限する栄養塩である。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微生物によって利用され循環している (Seike et al., 1990; 2004; Senga et al., 2001; 2002) (Fig. 1-1)。

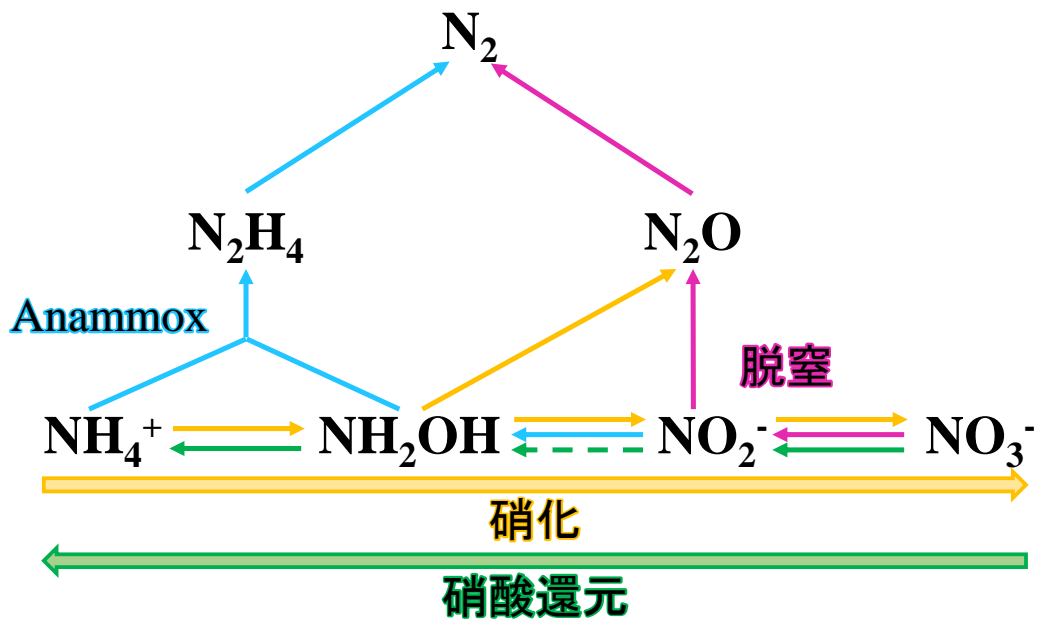
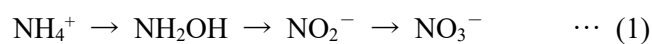
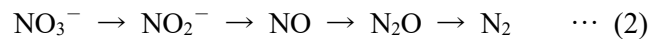


Fig. 1-1 水圏における微生物的窒素サイクル

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がバクテリアによって分解され、アミノ酸や尿素などの溶存有機態窒素を経て、 NH_4^+ となる (Mitamura and Saijo, 1980; Saijo et al., 1982)。その後、 NH_4^+ は (1) 式に示すように独立栄養細菌である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) (Laanbroek and Woldendorp, 1995)。



硝化反応は一般に光によって硝化細菌の活性を失うことが知られている (Takahashi and Saijo, 1982; Yoshioka and Saijo, 1985)。また、湖沼の溶存酸素がほとんどなくなると NO_3^- は、脱窒細菌の働きにより (2) 式に示すように中間体の亜酸化窒素(N_2O)を経て、最終的に分子状窒素(N_2)に還元される (脱窒反応) (Billen et al., 1985; Seitzinger, 1988)。



また、中間体として生成される N_2O は、京都議定書で削減対象ガスとして指定され、温暖化ガス及びオゾン破壊物質としても報告されている (Ravishankara et al., 2009)。

脱窒反応は、水中の窒素を N_2 ガスとして系外へと放出するため、水圏の窒素除去という点で非常に重要な反応である (Seitzinger, 1988)。

さらに近年では、 NH_4^+ から NO_3^- への完全酸化である Comammox 反応 (Daims et al., 2015; Kessel et al., 2015) や新たな窒素除去プロセスである Anammox 反応 (Mulder et al., 1995; Straus et al., 1999; Kuypers et al., 2003) が発見されている。また Anammox 反応では、 NH_4^+ と NO から中間体として N_2H_4 を経由し、 N_2 ガスを生成するタイプ (Kartal et al., 2016) と NH_4^+ と NO_2^- 由来の NH_2OH から中間体として N_2H_4 を経由し N_2 ガスを生成するタイプ (Oshiki et al., 2016; Kobayashi et al., 2019) の存在が報告されている。このように、窒素化学種は環境水中で多種多様な微生物等により利用され循環しており、自然環境・生命現象と深く関わっている。

また、湖沼において窒素化学種の増加により富栄養化すると、植物プランクトンの異常増殖が起こり、結果としてアオコや赤潮発生の原因となる。さらに、アオコや赤潮のような植物プランクトンの異常増殖 (有機物の生産) は、バクテリアによる有機物の分解を介して底層水中の溶存酸素を枯渇させ、水生生物のへい死を招くため漁業に悪影響を及ぼす。そのため、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。

本研究室では、時折植物プランクトンの異常増殖（アオコ）を引き起こす富栄養化したダム湖（布部ダム）において、リン及び窒素化学種の挙動を把握することを目的に調査を行った。その際、私はダム湖の有光層において高濃度の NH_2OH を蓄積する興味深い現象を発見した。植物プランクトンの生産層（有光層）における高濃度の NH_2OH の観測は、今回が初めてのことである。

NH_2OH は一般に硝化反応及び Anammox 反応の中間体として生成されることが知られているが（Fig. 1-2），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、硝化反応及び Anammox 反応が生じる可能性は低い。そのため、ダム湖の有光層において高濃度で検出された NH_2OH は、これらの反応により生成された可能性は低いと考えられる。

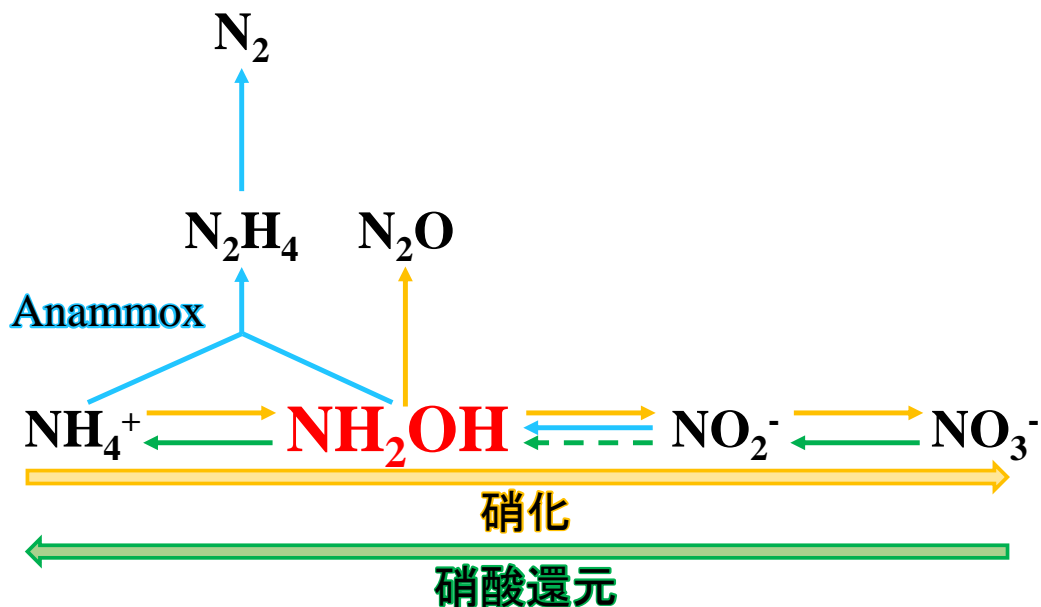


Fig. 1-2 NH_2OH の生成プロセス

さらに有光層において高濃度の NH_2OH が検出された際、植物プランクトンの指標である Chl-a 濃度も同層で高濃度で検出された。

植物プランクトンの代謝に関しては、海洋において、鉄欠乏による植物プランクトン

の増殖阻害が報告されている(Glover, 1977; Greene et al., 1991)。その後、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 et al., 2006; 武田, 2016), この原因が、鉄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放出にあることが報告された (武田, 2016)。しかしながら、植物プランクトンの代謝により NH_2OH が生成・放出されるという報告はない。

そこで本研究では、ダム湖の有光層において高濃度で検出された NH_2OH と植物プランクトンに注目した。 NH_2OH と植物プランクトンの指標である *Chl-*a** が同層で高濃度で検出されたことから、 NH_2OH と植物プランクトンの関係を検討することで、有光層で高濃度で検出される NH_2OH の由来の解明につながると考えられる。

本研究の目的及び本研究の構成

本研究室では、植物プランクトンの異常増殖（アオコ）を引き起こす富栄養化したダム湖（布部ダム）において、リン及び窒素化学種の挙動を把握することを目的に調査を行った。その際、私はダム湖の有光層において高濃度の NH_2OH を蓄積する興味深い現象を発見した。 NH_2OH は一般に硝化反応及び Anammox 反応の中間体として生成されることが知られているが、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、硝化反応及び Anammox 反応が起きる可能性は低い。そこで、フィールド調査により布部ダム表層における NH_2OH の挙動を調査した。その結果、高濃度の NH_2OH が検出された際には、植物プランクトンの指標となる Chl-*a* も高濃度で検出され、 NH_2OH と Chl-*a* に正の相関が認められたことから、 NH_2OH の生成起源は植物プランクトン由来の可能性があると考察した（第2章）。

NH_2OH の測定法には、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) , ヨウ素を用いて NH_2OH を NO_2^- に酸化し、その NO_2^- を比色定量する方法 (福森ら, 2003) があるが、これらの方法は、定量下限が環境水中で存在する濃度よりも 10 倍大きいことや定量範囲が狭いこと、定量操作が煩雑であるため環境試料への適用は難しい。そこで、環境水中の NH_2OH の測定には、酸化剤を用いて NH_2OH を N_2O に酸化し、これを ECD-GC で測定する方法が使用されている。この酸化剤として、次亜塩素酸ナトリウム溶液 (Seike et al., 2004; Kato et al., 2017) や Fe^{3+} (Breyman et al., 1982; Butler et al., 1986) を用いた方法がある。しかしながら、酸化剤として次亜塩素酸ナトリウム溶液を用いて有機物(植物プランクトン)を多く含む試料中の NH_2OH を測定した場合、植物プランクトンの影響を受けることを見出した (第2章)。そこで本研究では、次亜塩素酸よりも酸化力の低い Fe^{3+} を用いる方法 (Fe^{3+} 法) に着目し、それを改変することで、淡水、汽水、海水試料、並びに植物プランクトンの多い試料でも定量可能な Fe^{3+} を用いた NH_2OH の定量法の改良を

行った。また、本法を島根県の東部に位置する斐伊川や宍道湖、中海に適用し、その有用性について検討した（第3章）。

改良した 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の表層における NH_2OH の経月的変化と植物プランクトンの出現種を観察することで、植物プランクトンの種類と NH_2OH の発生の関係について調査した。その結果、三瓶ダムにおいても布部ダムでの結果と同様に、表層で高濃度の NH_2OH の検出を確認した。さらに、その際植物プランクトンの指標となる $\text{Chl-}a$ が高濃度で検出され、特にラン藻の異常増殖であるアオコの発生が確認された。また、ラン藻の NH_2OH 生成能を調べるために、三瓶ダムと宍道湖で採取し単離したラン藻の無菌培養株を用いて、培養実験を行い検討した。その結果、世界で初めてラン藻 *Dolichospermum crassum* と *Coelosphaerium* sp. における NH_2OH の生成を明らかにし、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提示した（第4章）。

第2章 布部ダム表層における NH_2OH の由来の検討

はじめに

水圏において、 NH_4^+ や NO_2^- , NO_3^- , NH_2OH や N_2O のような窒素化学種は細菌等、微生物を介して循環している (Seike et al., 1990; 2004; Senga et al., 2001; 2002)。例えば、懸濁物に含まれる有機態窒素がバクテリアによって分解され、アミノ酸や尿素などの溶存有機態窒素を経て、 NH_4^+ となる (Takahashi and Saijo, 1983)。その後、酸素のある好気的環境において硝化反応により NH_4^+ は酸化され NH_2OH や NO_2^- などの中間体を経て NO_3^- になる (Laanbroek and Woldendorp, 1995)。硝化反応は一般に光によって硝化細菌の活性を失うことが知られている (Takahashi and Saijo, 1982; Yoshioka and Saijo, 1985)。また、湖沼の溶存酸素がほとんどなくなると NO_3^- は、脱窒反応により N_2 に還元されたり (Billen et al., 1985; Seitzinger, 1988)、硝酸還元反応により NO_2^- などの中間体を経て NH_4^+ に還元される (Smith and Zimmerman, 1981; Fazzolari et al., 1990)。

NH_2OH は、水圏の窒素サイクルにおいて、硝化反応の中間体として生成されることが知られている (Hofman and Lee, 1952; Tanaka, 1953)。また近年では、新たな窒素除去プロセスである Anammox 反応の中間体として生成されることも見出されており (Mulder et al., 1995; Straus et al., 1999; Kuypers et al., 2003), NH_2OH は微生物の窒素代謝における重要な窒素化学種である。

本研究室では、植物プランクトンの異常増殖 (アオコ) を引き起こす富栄養化したダム湖 (布部ダム) において、リン及び窒素化学種の挙動を把握することを目的に調査を行った。その際、私はその有光層において高濃度の NH_2OH を蓄積する興味深い現象を発見した。 NH_2OH は一般に硝化反応及び Anammox 反応の中間体として生成されることが知られているが、表層においては光や酸素の影響を受けるため、これらの反応が起

きる可能性は低い。したがって、硝化反応及び Anammox 反応により生成されたものではないと考えられる。またこの時、植物プランクトンの指標である Chl-*a* 濃度も同層で高濃度であった。これまでの本研究室での研究では、中海湖心の底層において Anammox 由来の NH₂OH を観測しているが (Kato et al., 2017) , 植物プランクトン起源を示唆する NH₂OH の観測は、今回が初めてのことである。

植物プランクトンの代謝に関しては、海洋において、鉄欠乏による植物プランクトンの増殖阻害が報告されている (Glover, 1977; Greene et al., 1991)。その後、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 et al., 2006; 武田, 2016), この原因が、鉄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放出にあることが報告された (武田, 2016)。しかしながら、植物プランクトンの窒素代謝により NH₂OH が生成・放出されるという報告はない。

そこで本研究では、ダム湖の有光層において高濃度で検出された NH₂OH と植物プランクトンに注目し、NH₂OH の挙動の把握及び解明を目的に、フィールド調査を行った。

材料と方法

調査地点

布部ダムは、1963 年に中海の最大流入河川である飯梨川の上流に建設され、農業用かんがい、発電、および飯梨川の洪水調節として利用されている多目的ダムである。また、このダム湖は 1 年を通して水深が大きく変化するため、深度ではなく標高 (EL: Elevation) で示している。

フィールド調査は、島根県の東部に位置する布部ダム (35°17'11"N, 133°09'12"E)において、2014 年 6 月～2015 年 12 月の期間に月 1 回の頻度で行った。調査地点は布部ダ

ム内の M1, M5, M6 及び M7 の 4 地点(Fig. 2-1)にて行った。

このダム湖は、富栄養化しており、夏の初めから秋にかけて深水層が無酸素化する。また、近年では夏季にアオコが毎年確認されている。

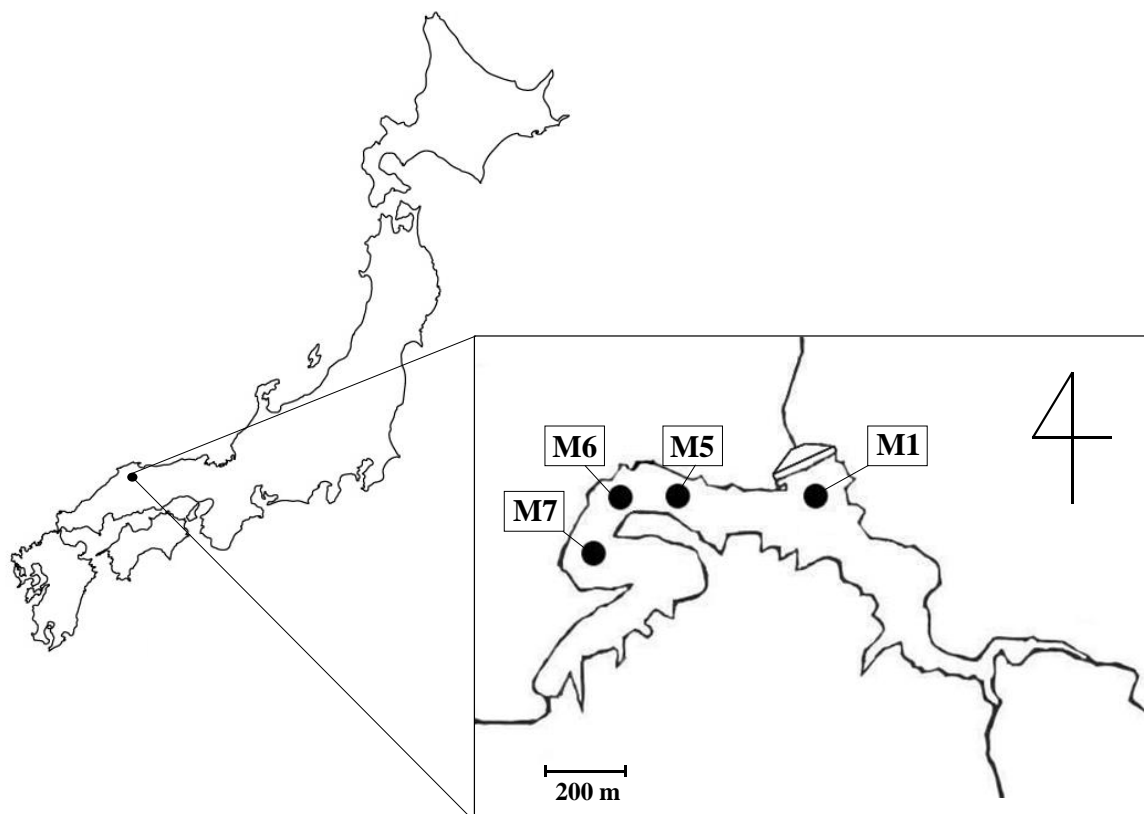


Fig. 2-1 布部ダムにおける調査地点

調査方法

採水は、北原式採水器（離合社 リゴ- B 号透明採水器）を用いて行い、70 mL バイアル瓶に試料水を満たし、ブチルゴムとアルミシールを用いて密封した。N₂O 定量用バイアル瓶にはホルマリン 1 mL, NH₂OH 定量用バイアル瓶には 3.5 mM 次亜塩素酸ナトリウム溶液を 1.5 mL 添加し、それぞれ N₂O 及び NH₂OH の試料に供した。また、NH₄⁺, NO₂⁻, NO₃⁻ 定量用試料水をポリ瓶に採取し、ガラスフィルター（Whatman GF/C, 粒子保持

能 1.2 μm) を用いてろ過を行い、ろ過後のろ紙を Chl-*a* の試料に供した。NH₄⁺、NO₂⁻、NO₃⁻については、ろ過水を実験室に持ち帰った後、すぐに分析を行った。また水中の水溫、溶存酸素 (DO)、酸化還元電位 (ORP)、濁度(Turb)及び pH は、多項目水質計 (Hydrolab Detasonde5) を用いて現場にて測定した。

試薬

N₂O、NH₂OH の定量

NH₂OH 標準液 (500 mgN L⁻¹) は、塩化ヒドロキシルアンモニウム (富士フイルム和光純薬, 特級) を 0.2481g 秤量後、窒素置換した超純水 (MQW) で溶かし 100 mL とした。これを使用時に窒素置換した MQW で適宜希釈して使用した。この標準溶液は使用の度に調製した。

N₂O 標準ガスは、純 N₂O ガス (99.5%, ジャパンファインプロダクツ)を使用した。

次亜塩素酸ナトリウム溶液は、次亜塩素酸ナトリウム溶液 (関東化学, 鹿一級) 2.5 mL をイオン交換水 (IEW) で 50 mL とした。さらにこれを 5 mL とり IEW を加えて 100 mL とし、3.5 mmol L⁻¹に調製した。この溶液は使用の度に調製した。

N₂ガスは、純窒素(純度 99.99995%以上, ジャパンファインプロダクツ)を使用した。ホルムアルデヒド溶液は、ホルムアルデヒド(富士フイルム和光純薬, 特級) を使用した。

NH₄⁺の定量

NH₄⁺標準溶液 (1000 mgN L⁻¹)は、110 °Cで4~24時間乾燥した塩化アンモニウム (富士フィルム和光純薬, 特級) 0.3819 gをMQWに溶かし、1000 mLとした。

ニトロプルシッドナトリウム溶液は、ニトロプルシッドナトリウム (富士フィルム和光純薬, 特級) 1 gをMQWに溶かし100 mLに調製し、着色ガラス瓶に入れ、冷暗所で保存した。この溶液は月に一度作り替えた。

フェノール溶液は、フェノール溶液 (富士フィルム和光純薬, 特級) 10 gにエタノール (富士フィルム和光純薬, 特級) 10 mLを加えて完全に溶かし、MQWで100 mLとし、これを褐色ガラス瓶に入れ、冷暗所で保存した。この溶液は月に一度作り替えた。

次亜塩素酸ナトリウム溶液 (有効塩素量 0.08~0.11 w/v%)は、次亜塩素酸ナトリウム溶液 (関東化学, 鹿一級) 10 mLに2.5%水酸化ナトリウム溶液 (富士フィルム和光純薬, 特級) 20 mL加え、MQWに溶かし、100 mLとした。この混合溶液は使用の度に調製した。

NO₂⁻の定量

NO₂⁻標準溶液 (100 mgN L⁻¹)は、110 °Cで4時間乾燥させた亜硝酸ナトリウム (富士フィルム和光純薬, 特級) をデシケーターで放冷後、0.1231 gをIEWで正確に250 mLとした。使用時に適宜希釈して用いた。また、作成したNO₂⁻標準溶液を褐色瓶に入れ冷暗所で保管し、1ヶ月ごとに調製し直した。

スルファニルアミド溶液は、スルファニルアミド (富士フィルム和光純薬, 特級) 2 gを塩酸 (富士フィルム和光純薬, 特級) 20 mLに溶かしIEWで200 mLとした。作成したスルファニルアミド溶液を褐色瓶に入れ冷暗所で保管した。この溶液は1ヶ月ごとに調製し直した。

ナフチルエチレンジアミン溶液は、*N*-(1-ナフチル) エチレンジアミン二塩酸塩 (富士フィルム和光純薬, 特級) 0.2 g を IEW に溶かし 200 mL とした。作成したナフチルエチレンジアミン溶液を褐色瓶に入れ冷暗所で保管した。この溶液は 1 ヶ月ごとに調製し直した。

NO₃⁻の定量

NO₃⁻標準溶液 (100 mgN L⁻¹)は、110 °Cで 4 時間乾燥させた硝酸カリウム (富士フィルム和光純薬, 特級) をデシケーターで放冷後、0.1805 g を IEW で正確に 250 mL とした。使用時に適宜希釈して用いた。作成した NO₃⁻標準溶液を褐色瓶に入れ冷暗所で保管し、1 ヶ月ごとに調製し直した。

NO₂⁻標準溶液 (100 mgN L⁻¹)は、110 °Cで 4 時間乾燥させた亜硝酸ナトリウム (富士フィルム和光純薬, 特級) をデシケーターで放冷後、0.1231 g を IEW で正確に 250 mL とした。使用時に適宜希釈して用いた。作成した NO₂⁻標準溶液を褐色瓶に入れ冷暗所で保管し、1 ヶ月ごとに調製し直した。

カドミウムは、カドミウム小片 (富士フィルム和光純薬, 特級 硝酸測定用)を使用した。

0.24 mol L⁻¹ 塩酸は、IEW に濃塩酸 (富士フィルム和光純薬, 特級) 10 mL を加え、全量を 500 mL とした。

0.3 mol L⁻¹ 硝酸は、IEW に濃硝酸 (富士フィルム和光純薬, 特級) 10 mL を加え、全量を 500 mL とした。

conc.塩化アンモニウム溶液は、塩化アンモニウム (富士フィルム和光純薬, 特級) 25 g を IEW 100mL に溶解した。

dil.塩化アンモニウム溶液は、conc.塩化アンモニウム溶液 25 mL を IEW で 1000 mL とした。

2%硫酸銅溶液は、硫酸銅五水和物 (富士フィルム和光純薬, 特級) 10 g を IEW に溶かし 500 mL とした。

スルファニルアミド溶液は、スルファニルアミド (富士フィルム和光純薬, 特級) 2 g を塩酸 (富士フィルム和光純薬, 特級) 20 mL に溶かし IEW で 200 mL とした。作成したスルファニルアミド溶液を褐色瓶に入れ冷暗所で保管した。この溶液は1ヶ月ごとに調製し直した。

ナフチルエチレンジアミン溶液は、*N*-(1-ナフチル) エチレンジアミン二塩酸塩 (富士フィルム和光純薬, 特級) 0.2 g を IEW に溶かし 200 mL とした。作成したナフチルエチレンジアミン溶液を褐色瓶に入れ冷暗所で保管した。この溶液は1ヶ月ごとに調製し直した。

Chl-*a* の定量 (すりつぶし法)

90%アセトン溶液は、アセトン(富士フィルム和光純薬, 特級) 900 mL に IEW 100 mL を加え、これを着色ガラス瓶に保存した。

化学分析

N₂O 及び NH₂OH の分析には ECD-GC (Shimazu GC-14B) を用い、カラムは Unibeats C (Mesh 80/100) を充填したステンレスカラム (長さ: 2 m, 内径: 2.6 mm) を使用した。キャリアガスには、高純度 N₂ ガス (>99.99995%) を用い、流速 50 mL min⁻¹ で使用した。注入口と検出器の温度は 200°C と 300°C に、カラム温度は 130°C にそれぞれ設定した。

N₂O の定量は、N₂ ガスで気相を作成し気相中の N₂O を ECD-GC にて測定し、液相中

の N_2O 濃度は Weiss and Price (1980) の式を用いて算出した。 NH_2OH は 3.5 mmol L^{-1} 次亜塩素酸ナトリウム溶液で酸化させ N_2O として定量する方法 (Seike et al. (2004) ; Kato et al. (2017))により測定した。

NH_4^+ , NO_2^- 及び 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), 及び Cd-Cu アマルガム-ナフチルエチレンジアミン法 (Wood et al., 1967)により定量した。Chl-*a* は, Parsons T. and Strickland J. (1963)及び SCOR/UNESCO 法 (UNESCO, 1966)により定量した。これらは吸光光度計 (Shimadzu UV-1800-type) を用いて測定した。また, pH は pH 計 (Horiba F-23) を用いて測定した。

N_2O 及び NH_2OH の定量方法

N_2O または NH_2OH 標準溶液を脱酸素水で希釈し 50 mgN L^{-1} , 5 mgN L^{-1} , $500 \text{ }\mu\text{gN L}^{-1}$, および $100\text{ }\mu\text{gN L}^{-1}$ に調製した。あらかじめガラスビーズを 1 個入れた褐色バイアル瓶 (70 mL)に, 窒素置換した MQW を充填しアルミキャップとブチルゴムで密封した後, 標準溶液をイトーマイクロシリンジ(1 mL)で既定量添加し検量線とした。

現場では, あらかじめガラスビーズをいれた NH_2OH 定量用の褐色バイアル瓶 (70 mL)と N_2O 定量用の透明バイアル瓶(70 mL)を試料水で満たして密封し, NH_2OH 定量用バイアル瓶に次亜塩素酸ナトリウム溶液を 1.5 mL, N_2O 定量用バイアル瓶にはホルマリン 1.0 mL を添加し攪拌した。その後, 実験室に持ち帰り NH_2OH , N_2O 定量用バイアル瓶共に, 窒素ガスを 40 mL 注入して気相を作り, 攪拌して気液平衡の状態にし, ECD-GC にイトーマイクロシリンジを用いて気相を 0.2 mL 注入し測定した (Fig.2-2)。ECD-GC (Shimadzu GC-14B) のカラムは Unibeads C (Mesh 80/100) を充填したステンレスカラム (長さ: 2 m, 内径: 2.6 mm)を使用した。また, CaSO_4 (ドライライト) を充填したガラスカ

ラム (長さ: 8 cm, 内径: 7 mm) を試料中の H₂O 吸収プレカラムとして用いた。キャリアガスには, 高純度 N₂ ガス (>99.99995%) を用い, 流速 50 mL min⁻¹ で使用した。注入口と検出器の温度は 200°C と 300 °C に, カラム温度は 130 °C にそれぞれ設定した。本法の定量下限は 0.2 μgN L⁻¹ であった。気相中の N₂O 濃度は上記のガスクロマトグラフで測定し, 液相中の N₂O 濃度は, Weiss and Price (1980) の式を用いて算出した。NH₂OH は N₂O のピークエリアの値を引いた数値を用いて検量線から濃度を求めた。

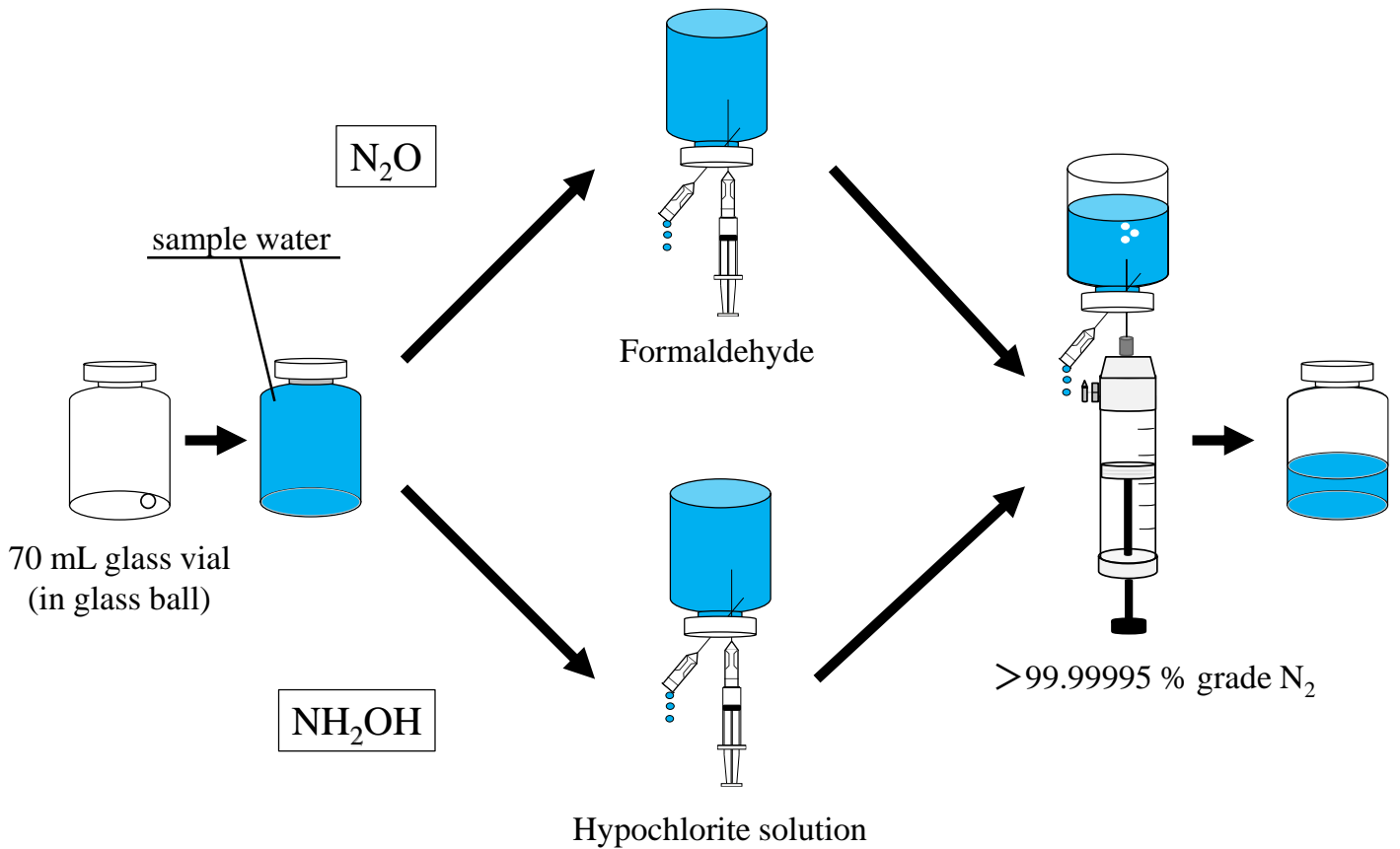


Fig. 2-2 N₂O 及び NH₂OH の定量操作

植物プランクトンの形態観察と同定

試料水は、採水後速やかに、次の方法により濃縮を行った後検鏡した。試料水 200 mL を口径 0.45 μm のメンブランフィルターにより緩やかに吸引ろ過した後、フィルター表面に集積した植物プランクトンをミクロスパーテルを用いてかきとり、試料水約 1.5 mL でサンプルチューブに流し込み、さらに試料水で 2 mL にまでメスアップし、100 倍濃縮試料とした。さらに、100 倍濃縮試料に 2.5% グルタルアルデヒド約 2 mL を加えて固定試料とした。検鏡時には、固定試料の上澄みを捨て、沈殿した試料を 5% ホルマリンを用いて全量が 2 mL になるように調整して 100 倍濃縮試料を作成し検鏡に供した（野尻ら, 2019）。

検鏡は光学顕微鏡（Olympus BX60, Japan）を用い、400 倍と 1000 倍の倍率で行った。群体もしくは細胞の大きさを計測する際は、1000 倍の倍率で対物マイクロメータを用いて、各々の試料から無作為に 10 以上の対象物を選んで測定を行った。

培養株の作成と培養実験

NH_2OH の生成の有無の検証には次のラン藻の培養株を用いた。本種は、布部ダムにてアオコが発生し、かつ表水層で高濃度の NH_2OH が検出された際に確認された *Microcystis* sp. を用いた。この *Microcystis* sp. の培養株については、島根県中央部に位置する三瓶ダムから単離したものを使用した。

培養実験では、CA 培地（Ichimura and Watanabe, 1974）を用いた。300 mL の三角フラスコに CA 培地 250 mL を満たし、オートクレーブ（121°C, 20 分）を用いて滅菌したものを使用した。これに培養株を 10 mL 接種し、卓上型人工気象器（NK system, LH-60FL12-DT）にて 12 時間明暗周期（1120~1350 lx）、20°C の条件下で培養を行い、 NH_2OH の生成の有無を検証するために NH_2OH と Chl-*a* の測定を行った。

ラン藻の培養株は、実体顕微鏡下で滅菌済みパスツールピペット（Godo et al., 2017;

Hayashi et al., 2019) を使用したピペット洗浄法 (Pringsheim, 1946) により試験水から 1 群体取り出し, 滅菌済みの CA 培地で洗浄した後, 培養試験管に移し上記条件で培養した。

結果と考察

布部ダムにおける窒素化学種の鉛直分布

Fig.2-3 に布部ダムにおける 2014 年 8 月 4 日と 2017 年 9 月 27 日の窒素化学種及び Chl-*a* の鉛直分布を示した。

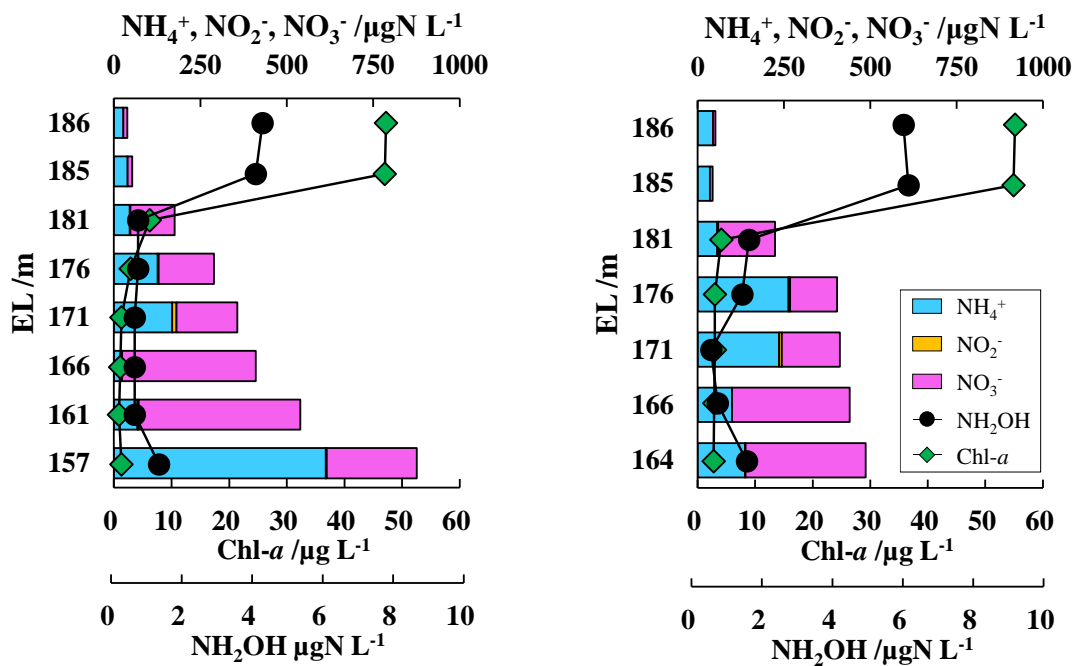


Fig. 2-3 布部ダムにおける窒素化学種及び Chl-*a* の鉛直分布 (生データ)

(左 : 2014.8.4, 右 : 2017.9.27)

両日ともに、表層 0 m と 1 m にあたる EL 186 m と EL 185 m で 4.1~6.1 $\mu\text{gN L}^{-1}$ と高濃度の NH_2OH が検出された。 NH_2OH は硝化反応及び Anammox 反応の中間体として生成されることが知られているが、表層においては、光により阻害を受ける硝化反応や酸素のない嫌気的環境で起きる硝酸還元反応や Anammox 反応は起き難い。このことから、表層において高濃度で検出された NH_2OH は、硝化反応及び Anammox 反応により生成された可能性は低いと考えられる。さらに、表層において高濃度で NH_2OH が検出された際には、植物プランクトンの指標となる Chl-*a* も NH_2OH と同様に 47.0~55.2 $\mu\text{g L}^{-1}$ と高濃度で検出され、 NH_2OH が高濃度で検出された際には、同層で Chl-*a* も高濃度で検出されることがわかった。

NH_2OH と Chl-*a* の時系列変化

布部ダムにおける窒素化学種と Chl-*a* の鉛直分布より、 NH_2OH が高濃度で検出された際には、植物プランクトンの指標となる Chl-*a* も同層において高濃度で検出されたことから、 NH_2OH と Chl-*a* に注目した。Fig. 2-4 に布部ダム内の M1 及び M5 の表層 1 m における 2014 年 6 月から 2015 年 12 月の NH_2OH と Chl-*a* の時系列変化を示した。

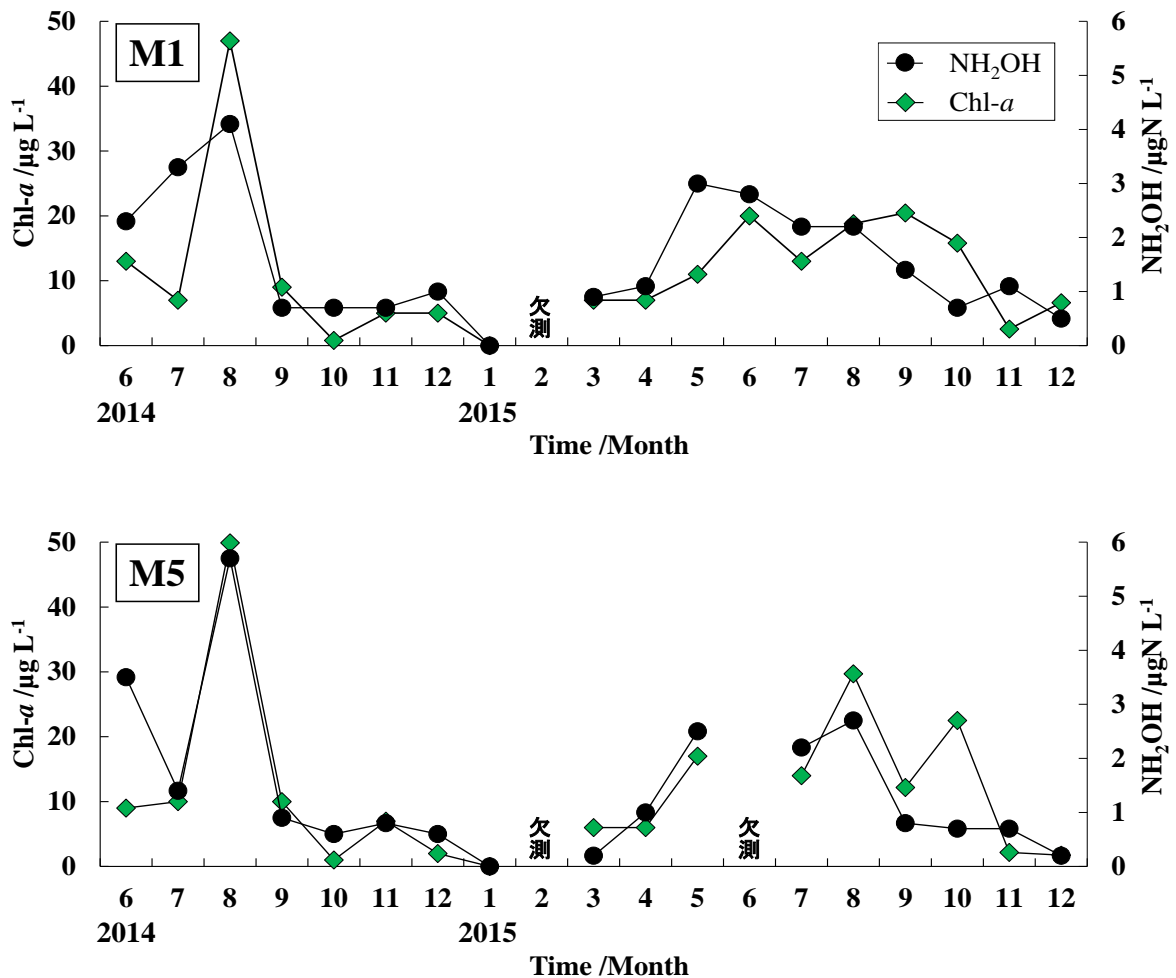


Fig. 2-4 表層 1 m における NH₂OH と Chl-*a* の時系列変化

NH₂OH は概ね 5 月～9 月の夏季において高濃度で検出された (Fig.2-4)。また、植物プランクトンの指標となる Chl-*a* についても、NH₂OH と同様に他の月と比較して 5 月から 9 月の時期に比較的高濃度で検出された。さらに、7 月～9 月には目視にてラン藻が異常増殖した状態であるアオコの発生が確認されている。これらの結果より、植物プランクトンの増殖により Chl-*a* が高濃度で検出された際に、NH₂OH が同層において高濃度で検出されることがわかった。

NH₂OH と Chl-*a* の相関について

Fig. 2-4 より, Chl-*a* と NH₂OH の変動パターンが比較的類似していることが分かった。NH₂OH と Chl-*a* の時系列変化より, Chl-*a* が高濃度で検出された際に, NH₂OH が有光層において高濃度で検出されることがわかった。そこで, NH₂OH と Chl-*a* にどのくらい相関があるかどうかを検討した。そこで, NH₂OH と水質パラメータ (Chl-*a*, NH₄⁺, NO₂⁻, NO₃⁻, 水温 (WT), pH, 及び溶存酸素 (DO)) との相関性について検討した。Table 2-1 に 2014 年 6 月~2015 年 12 月の 4 地点(M1, M5, M6, 及び M7)における NH₂OH, Chl-*a*, NH₄⁺, NO₂⁻, NO₃⁻, DIN, WT, pH, 及び DO の相関行列を, Fig. 2-5 に, NH₂OH と Chl-*a* の相関関係をそれぞれ示した。データは NH₂OH が高濃度で検出された表層 0 m 及び 1 m の値を使用している ($n=110$)。その結果, NH₂OH と高い相関性がみられた水質項目は, Chl-*a*, NO₃⁻, WT, 及び pH であり, そのうち NH₂OH と正の相関を示したのは, Chl-*a*, WT 及び pH であり, NO₃⁻とは負の相関を示した。一方, Chl-*a* と高い相関性を示した水質項目をみると, WT と pH がそれぞれ正の相関を示し, NO₃⁻とは負の相関を示した。さらに, NO₃⁻は WT 及び pH とそれぞれ高い負の相関を示した。これは WT の上昇に伴い, Chl-*a* が増加することで植物プランクトンの活発な光合成により CO₂ が消費され, pH も上昇すると共に, NO₃⁻は植物プランクトンの摂取により減少したことを示している。また, NH₂OH と NO₃⁻との高い負の相関 $R=-0.76$ ($p<0.01$) も NO₃⁻の減少に伴う NH₂OH の増加を示しており, 植物プランクトンとの因果関係を支持する。

また, NH₂OH と Chl-*a* の相関 ($n=110$) から, $R=0.70$ と比較的高い正の相関 ($p<0.01$) を示した。これらの結果もまた, 有光層における NH₂OH の生成が植物プランクトンに由来する可能性の高いことを支持する。

Table 2-1 NH₂OH と水質パラメータの相関関係($n=110, p<0.05, *; p<0.01, **$)

	NH ₂ OH	Chl- <i>a</i>	NH ₄ ⁺	NO ₂ ⁻	NO ₃ ⁻	WT	pH	DO
NH ₂ OH		0.70**	-0.13	-0.02	-0.76**	0.76**	0.72**	0.30**
Chl- <i>a</i>			-0.22*	-0.29**	-0.59**	0.66**	0.58**	0.31**
NH ₄ ⁺				0.15	0.30**	-0.23**	-0.36*	-0.52**
NO ₂ ⁻					-0.11	-0.01	0.06	-0.14
NO ₃ ⁻						-0.90**	-0.81**	-0.33**
WT							0.79**	0.18
pH								0.57**
DO								

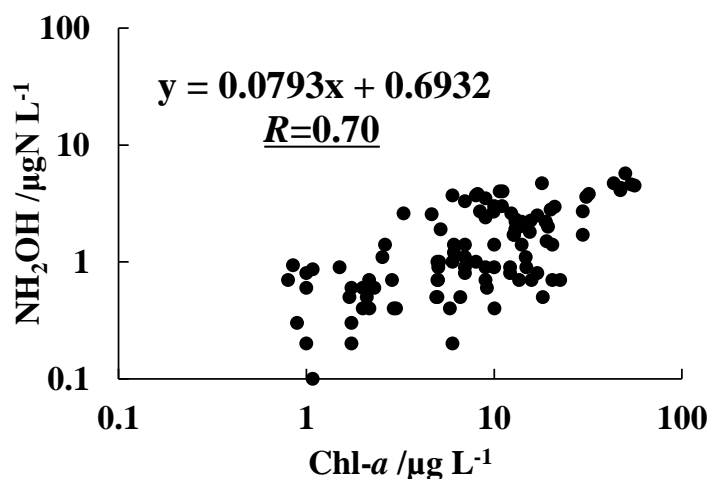


Fig. 2-5 NH₂OH と Chl-*a* の相関 (表層 0 m 及び 1 m)

次亜塩素酸法を用いた NH₂OH 定量の際の有機物 (植物プランクトン) の影響

有機物 (特に植物プランクトン) を多く含むサンプルに対し、酸化剤として次亜塩素酸を用いて NH₂OH の定量を行った際、次亜塩素酸と有機物が化学反応し、次亜塩素酸ナトリウムの不足による NH₂OH の過小評価が懸念された。そこで、NH₂OH 定量の際にどの程度植物プランクトンの影響を受けるのかを検討するため、各濃度に調製した植物プランクトンを含む溶液中 (Chl-*a*: 0~160 µg L⁻¹) の NH₂OH を次亜塩素酸法で測定

した(Fig. 2-6)。その結果、次亜塩素酸法では植物プランクトンの指標となる Chl-*a* の増加に比例して NH₂OH の測定結果は減少し、Chl-*a* が 80 μg L⁻¹ の時には NH₂OH の定量に対し 2 割程度減少することがわかった。このことから、次亜塩素酸法はアオコが発生しているような植物プランクトン由来の有機物が多い水域においては、NH₂OH の測定結果が植物プランクトンの影響を受けている可能性がある。

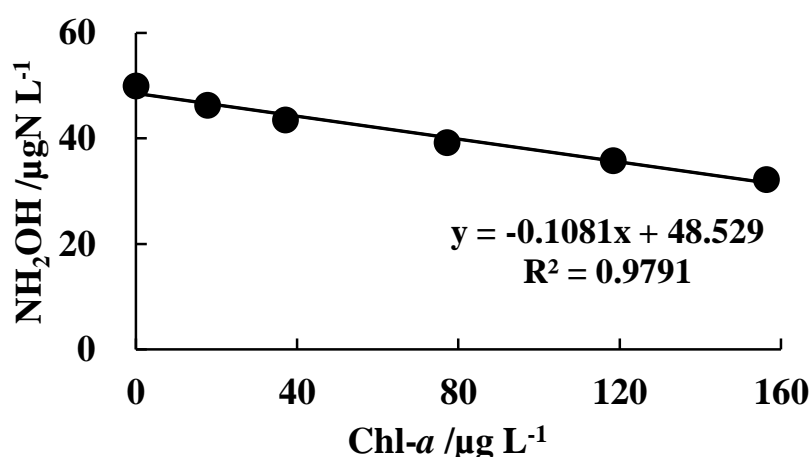


Fig. 2-6 次亜塩素酸法を用いた NH₂OH の定量における Chl-*a* の影響

補正した NH₂OH と Chl-*a* の相関について

前述の通り、酸化剤として次亜塩素酸を用いた NH₂OH の定量において、植物プランクトン(有機物)の影響を受けることがわかった。そこで、NH₂OH の実測値を、Fig. 2-6 の式より Chl-*a* の影響を考慮した NH₂OH を計算し補正した。この結果を用いて NH₂OH と Chl-*a* の相関を算出した結果、Chl-*a* の影響を考慮し補正した NH₂OH の計算値と Chl-*a* の相関 (n=110) は、NH₂OH の実測値を用いた結果よりもわずかに高い R=0.74 の正の

相関 ($p < 0.01$) を示した(Fig. 2-7)。このことから、表層における NH_2OH と植物プランクトンの指標となる $\text{Chl-}a$ には相関があり、また、現場における NH_2OH の測定値は、わずかながら $\text{Chl-}a$ の影響を受けていることがわかった。

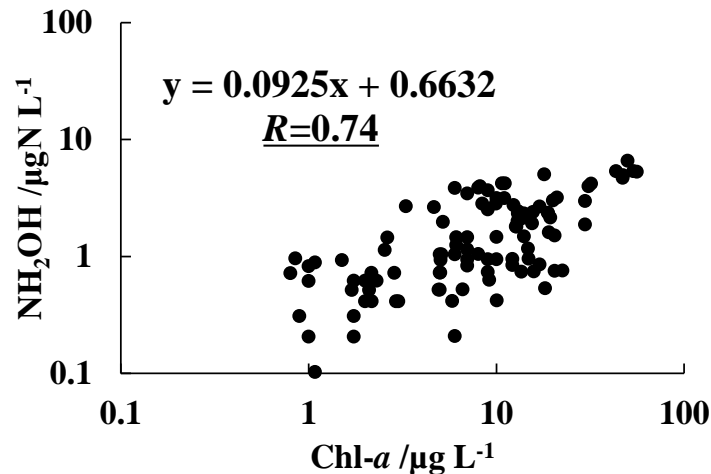


Fig. 2-7 $\text{Chl-}a$ と Fig. 2-6 により補正した NH_2OH の相関 (表層 0 m 及び 1 m)

植物プランクトンの形態観察と同定及びラン藻による NH_2OH の生成

NH_2OH が表水層において高濃度で検出された 2017 年 9 月 27 日に存在した植物プランクトンの種類について、検鏡に基づく形態観察により同定・確認した。その結果、ラン藻でアオコ形成種の *Microcystis* sp. が確認された。

そこで、単離したラン藻の培養株を用いて NH_2OH の生成能について検討した。Fig. 2-8 には、*Microcystis* sp. を用いて行った培養実験の結果を示す。使用した *Microcystis* sp. は、布部ダムと同様に島根県に位置するダム湖で、夏季にはアオコの発生が問題となっている三瓶ダムから単離したものを使用した。その結果、*Microcystis* sp. の $\text{Chl-}a$ 濃度は、0 日目には $3 \mu\text{g L}^{-1}$ 、10 日目には $12 \mu\text{g L}^{-1}$ 、20 日目には $30 \mu\text{g L}^{-1}$ 、25 日目には $80 \mu\text{g L}^{-1}$

と時間の経過とともに増加した。そして NH_2OH 濃度も $\text{Chl-}a$ 濃度の増加に伴い増加するのが認められた。ここで用いた培養株は無菌ではなかったものの、本培養結果は *Microcystis sp.*による NH_2OH の生成を示唆した。

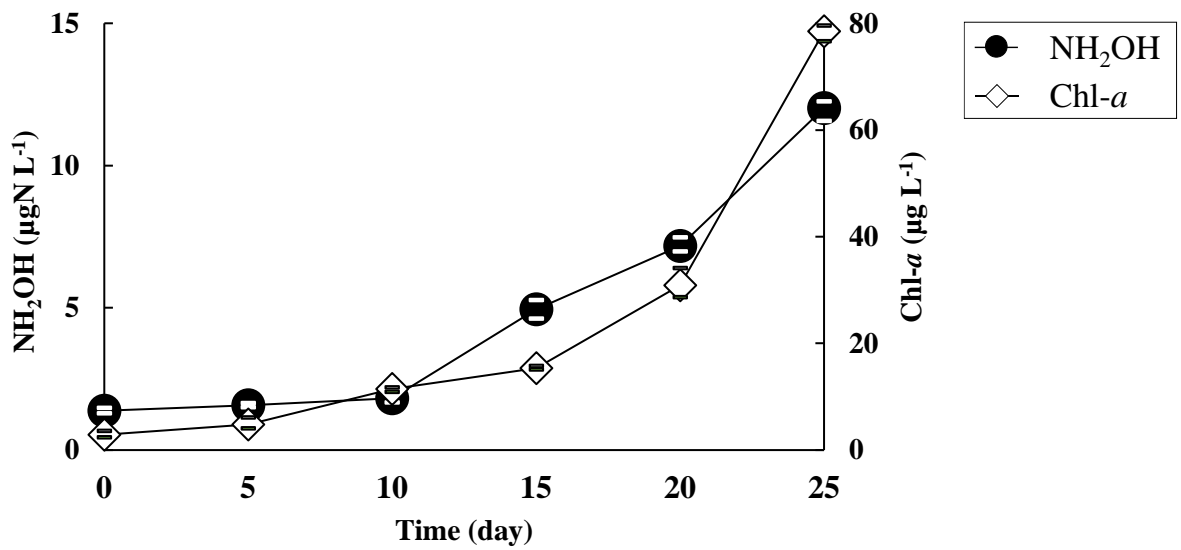


Fig. 2-8 *Microcystis sp.* の培養実験 (エラーバーは最大値及び最小値を示す)

まとめ

布部ダムにおけるフィールド調査により、夏季に有光層において高濃度の NH_2OH が検出された。 NH_2OH は一般に硝化反応及び 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は光や酸素の影響を受けるため、これらの反応が起きる可能性は低い。また、 NH_2OH が高濃度で検出された際、植物プランクトンの指標となる Chl-*a* も高濃度で検出され、さらに NH_2OH と Chl-*a* には正の相関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も Chl-*a* 濃度の増加に伴い NH_2OH 濃度の増加が認められた。

以上の結果より、夏季において表水層で検出される NH_2OH は、植物プランクトンと関係がある可能性が示唆された。

第3章 Fe³⁺を用いた NH₂OH の定量法の改良

はじめに

水圏において、NH₄⁺、NO₂⁻、NO₃⁻、NH₂OH や N₂O のような窒素化学種は微生物を介して循環している(Seike et al., 1990; 2004; Senga et al., 2001; 2002)。その中でも NH₂OH は、水圏の窒素サイクルにおいて、硝化反応の中間体として生成されることが知られている (Hofman and Lee, 1952; Tanaka, 1953)。また近年では、新たな窒素除去プロセスである Anammox 反応の中間体として生成されることも見出されており (Mulder et al., 1995; Straus et al., 1999; Kuypers et al., 2003) , NH₂OH は微生物の窒素代謝における重要な窒素化学種であるため、NH₂OH を定量することは水圏の窒素代謝を理解するうえで非常に重要である。

しかしながら、NH₂OH の安定時間は pH 4.0 で数日、pH 7.8 では 60 分程度と報告されている (Anderson, 1954; Fiadeiro et al., 1967)。環境水中での pH は pH 6~8 であり、夏季には植物プランクトンの炭酸同化によりさらに pH は増加する (藤森, 2013)。そのため、環境水中の NH₂OH は不安定であり濃度が低い (Pittwell, 1975) ことから、直接定量するのは難しい。

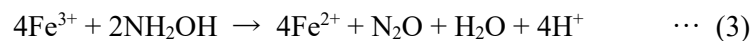
NH₂OH の測定法には、分光光度法 (Fiadeiro et al., 1977; Endres and Kaufmann, 1937; Novak and Wilson, 1948; Csaky, 1947) や滴定法 (Rao and Rao, 1942) , ヨウ素を用いて NH₂OH を NO₂⁻に酸化し、その NO₂⁻を比色定量する方法 (福森ら, 2003) がある。しかしながら、Table 3-1 に示すように Fiadeiro et al. (1977)の方法は定量の上限が小さく、かつ試料採取後 2~3 時間以内に測定しなければならない。また、Rao and Rao (1942)の方法は定量下限が環境水中に存在する濃度よりもはるかに大きく (検出感度が悪く) , 福森ら(2003)の方法は、亜硝酸及び塩分の妨害を取り除く必要があるため定量操作が煩雑

である。以上の理由により、これらの方法を環境水へ適用することは難しいと判断した。

Table 3-1 従来法における定量範囲

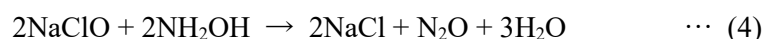
		定量範囲
		$\mu\text{gN L}^{-1}$
分光光度法	Fiadeiro et al. (1977)	0.015-3
滴定法	Rao and Rao (1942)	872-4361
分光光度法	福森ら (2003)	2-100

そのほかに、環境水中の NH_2OH の測定には、酸化剤を用いて NH_2OH を N_2O に酸化し、これを ECD-GC で測定する方法が使用されている。この酸化剤として、次亜塩素酸ナトリウム溶液(Seike et al., 2004; Kato et al., 2017) や Fe^{3+} (Breyman et al., 1982; Butler et al., 1986)を用いた方法がある。Breyman et al. (1982) や Butler et al. (1986) の方法は酸化剤として Fe^{3+} を用いて (3) 式に示すように NH_2OH を N_2O に酸化し (Fe^{3+} 法), ECD-GC で測定する定量法である。



しかしながら、Breyman et al. (1982) の方法は、 N_2O としての回収率が 50%と低く、その改変法である Butler et al. (1986) の方法は地点によって回収率 (40~80%) にばらつきがあるという問題点があった。

一方、Seike et al. (2004) や Kato et al. (2017) は次亜塩素酸ナトリウム溶液を用いて (4) 式に示すように NH_2OH を N_2O に酸化し (次亜塩素酸法), N_2O を ECD-GC で測定する定量方法を開発した。



Seike et al. (2004) の方法は淡水のみに適用可能であるが、Kato et al. (2017) の方法は淡水・汽水・海水に適応可能であり、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 : $0.2 \mu\text{gN L}^{-1}$) である。しかしながら、第 2 章でも述べた通り、この次亜塩素酸法は、次亜塩素酸ナトリウム溶液の酸化力が強い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の場合、有機物の分解に次亜塩素酸が消費されることで NH_2OH を酸化するための次亜塩素酸が不足し、過小評価されることが懸念された。

そこで本研究では、Butler ら (1986) の酸化剤として Fe^{3+} を用いる方法に注目し、淡水や汽水、海水サンプルに加えて植物プランクトンのような有機物を多く含む試料にも適用可能な NH_2OH の定量における測定条件、特に使用する緩衝溶液に注力して検討した。また、本法を島根県の東部に位置する斐伊川や宍道湖、中海に適用し有用性を検証した。

材料と方法

試薬

NH_2OH 標準液 (500 mgN L^{-1}) は、塩化ヒドロキシルアンモニウム (富士フィルム和光純薬, 特級) 0.2481 g を脱酸素水で溶かし 100 mL とした。これを原液として脱酸素水を用いて適宜希釈し使用した。標準溶液は使用の度に調製した。

塩化鉄(III)溶液 (105 mmol L^{-1}) は、 2.838 g の塩化鉄(III)6水和物 (富士フィルム和光純薬, 特級) を超純水 (MQW) に溶かし 100 mL とし調製した。

クロロ酢酸-水酸化カリウム緩衝液は、 13.22 g のクロロ酢酸 (富士フィルム和光純薬, 特級) と 1.692 g の水酸化カリウム (富士フィルム和光純薬, 特級) を MQW に溶かし 100 mL とし調製した。

N_2O 標準ガスは、純 N_2O ガス (99.5%, ジャパンファインプロダクツ) を使用した。

N₂ガスは、純窒素（純 99.99995%以上、ジャパンファインプロダクツ）を使用した。

ホルムアルデヒド溶液は、ホルムアルデヒド(和光純薬、特級)を使用した。

人工海水は、Lyman and Fleming の方法（Riley J. P. and Skirrows G., 1965）に従って調製した。NaCl 23.4 g, MgCl₂ 4.981 g, Na₂SO₄ 3.917 g, CaCl₂ 1.102 g, KCl 0.664 g, NaHCO₃ 0.192 g, KBr 0.096 g, H₃BO₃ 0.026 g, SrCl₂ 0.024 g, 及び NaF 0.003 g を MQW に溶かし 1 L とした。

装置

N₂O の定量には、ECD-GC（Shimazu GC-14B）を用いた。また、溶液中の pH は pH 計（Horiba F-23）を用いて測定した。

ECD-GC の測定条件

カラムは、Unibeads C（Mesh 60/80）を充填した 2 m long stainless-steel column（長さ：2 m, 内径：2.6 mm）を使用し、カラム温度は 130°C に設定した。また、注入口と検出器の温度はそれぞれ 200°C と 300°C に設定した。キャリアガスには高純度 N₂ ガス（> 99.99995%）を用い、流速 50 mL min⁻¹ で使用した。

Fe³⁺を用いる NH₂OH 及び N₂O の標準定量操作

Fig. 3-1 に Fe³⁺を用いた NH₂OH 及び N₂O の標準定量操作を示した。あらかじめガラスビーズを入れた 70 mL 褐色バイアル瓶に試料を満たし、ブチルゴムとアルミキャップを用いて密閉した。その後、クロロ酢酸-水酸化カリウム緩衝液 1.0 mL と NH₂OH を N₂O に酸化するため 105 mmol L⁻¹ 塩化鉄(III)溶液 1.0 mL を添加した。2 時間放置後、バイアル瓶にマグナムシリンジを用いて窒素ガス (99.99995%以上) 40 mL で気相を作成した。バイアル瓶を数分振った後、気相中の N₂O を測定するため、その気相 0.2 mL をイトーマイクロシリンジを用いて ECD-GC に注入した。液相中の N₂O の濃度は Weiss and Price の式により算出した。また、N₂O のブランクとしてクロロ酢酸-水酸化カリウム緩衝液と塩化鉄溶液を添加していない系 (ホルムアルデヒド溶液のみ添加した系) でも測定した。NH₂OH は、クロロ酢酸-水酸化カリウム緩衝液と塩化鉄溶液を添加して検出された N₂O から N₂O のブランクを差し引くことで求めた。

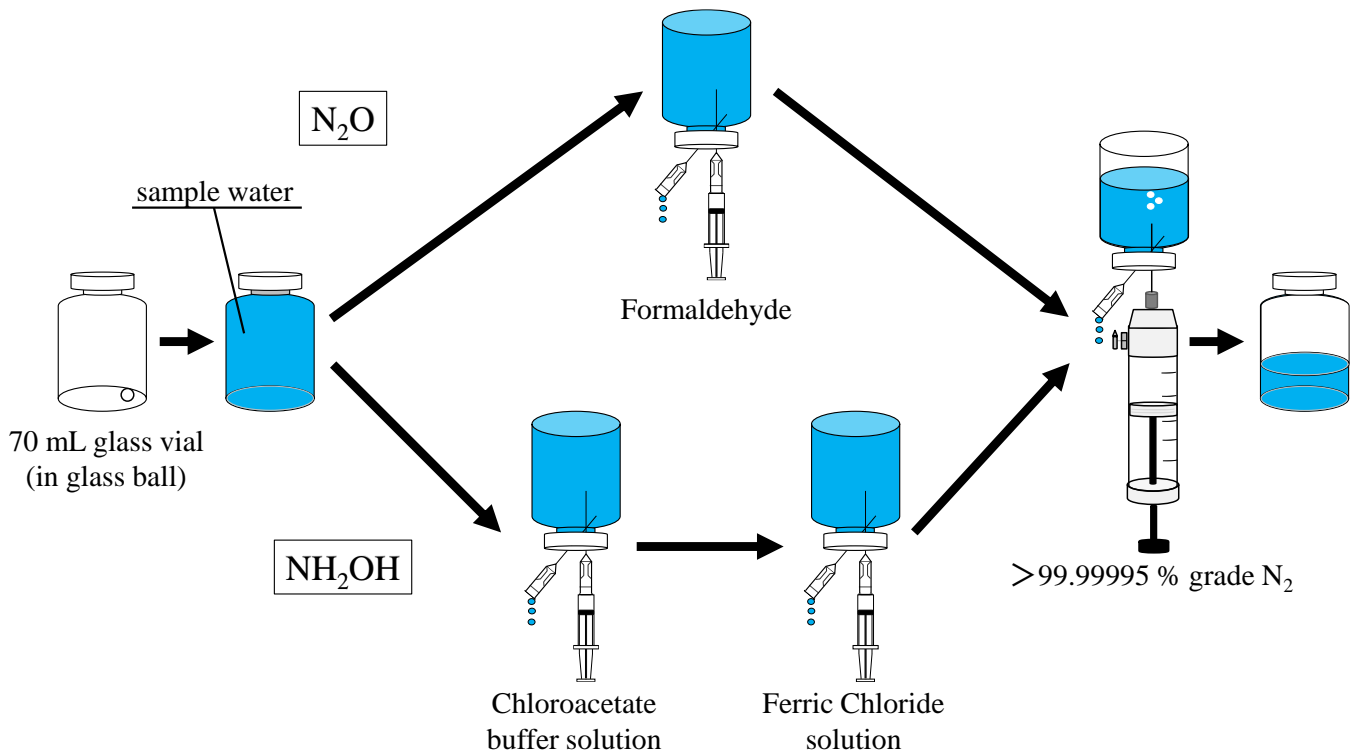


Fig. 3-1 Fe³⁺を用いる NH₂OH 及び N₂O の標準定量操作

実験結果と考察

Breymann et al. (1982) の方法は、酸化剤として Fe^{3+} を添加し、これにより生成された N_2O を定量し NH_2OH を算出している (Fig. 3-2)。しかしながら、Breymann et al. (1982) の方法は、 N_2O としての回収率が 50% と低い。また、その改変法である Butler et al. (1986) の方法は、pH 調整のために酢酸緩衝液を添加したのち、酸化剤として Fe^{3+} を添加する。しかしながら、Butler et al. (1986) の方法は地点によって回収率 (40~80%) にばらつきがある。そのため、Breymann et al. (1982) や Butler et al. (1986) の測定条件では環境水への適用は難しいと判断した。そこで、酸化剤として Fe^{3+} を用いる点に注目し、高感度での定量を可能にするため、Breymann et al. (1982) や Butler et al. (1986) の操作手順を基に、①pH の影響 ②pH の調整方法 ③ Fe^{3+} の最適濃度 ④放置時間 (反応時間) の検討を行い、測定条件の確立を行った (Fig. 3-3)。また、確立した測定条件を用いて、共存物質及びプランクトン (有機物) の影響について検討を行った。

海水中には Na^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} , K^+ , Cl^- , SO_4^{2-} 及び HCO_3^- が高濃度で含まれている。そこで Fe^{3+} を用いた NH_2OH の定量において汽水や海水サンプルを対象とした際、これらのイオンによる影響がないかどうかを確認するため、①pH の影響 ②pH の調整方法 ③ Fe^{3+} の最適濃度 ④放置時間 (反応時間) の検討において、MQW と人工海水 (artificial seawater; ASW) の両方でそれぞれ検討実験を行った。

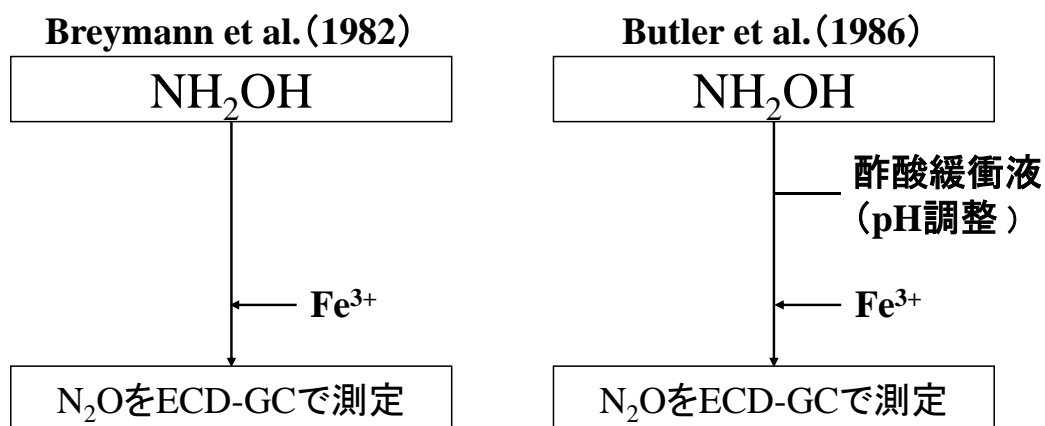


Fig. 3-2 Breymann et al. (1982) 及び Butler et al. (1986) の操作手順

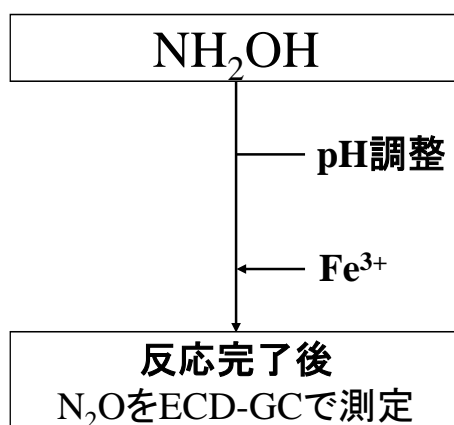


Fig. 3-3 本法における操作手順 (仮)

pH の影響

Fe^{3+} による NH_2OH の酸化に及ぼす pH の影響を、 N_2O としての回収率を基準に検討した。70 mL バイアル瓶に脱酸素した MQW または 35‰ASW で満たし、ブチルゴムとアルミキャップで密閉し、 NH_2OH が $50 \mu\text{gN L}^{-1}$ になるように添加した(Fig. 3-4)。その後、 105 mmol L^{-1} 塩化鉄溶液を 1.0 mL 添加し、塩化鉄溶液の添加後の pH を $[\text{H}^+] = 0.1 \sim 0.01 \text{ mol L}^{-1}$ 及び pH 2~8 の範囲で、水酸化ナトリウム溶液と希硫酸を用いて調整した。2 時間放置後、窒素ガスで気相を作成し、気液平衡後、気相中の N_2O を ECD-GC で測定し、液相中の N_2O は Weiss and Price (1980)の式により算出した。

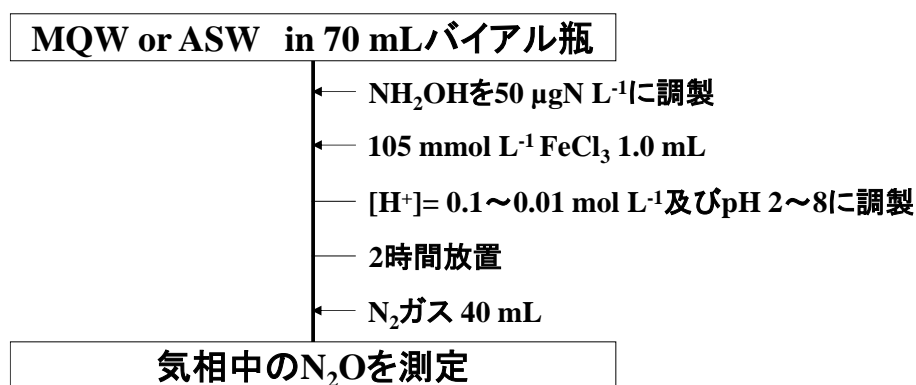


Fig. 3-4 pH による影響の操作方法

その結果、回収率は、MQW と ASW でともに pH 2.00~2.85 の時、最大かつ一定の値が得られ、ほぼ 100%であった(Fig. 3-5)。また、MQW と ASW で回収率に大きな差は見られないことから、本法の最適 pH を MQW と ASW とともに pH 2.00~2.85 と判断した。

また、pH 3 以上の時に MQW と ASW の両方で黄橙色の沈殿を形成していたことから (Fig. 3-6)、この黄橙色の沈殿は Fe(OH)₃ であると考えられた。Fe(OH)₃ の溶解度積 K_{sp} は 1.0×10⁻³⁶ (Day Jr. R. A. and Underwood A. L., 1980), [Fe³⁺]は 1.5 mmol L⁻¹ であることから、pH を計算すると以下の通りとなる

$$K_{sp} = [\text{Fe}^{3+}][\text{OH}^{-}]^3 = 1.0 \times 10^{-36}$$

$$[\text{OH}^{-}]^3 = 1.0 \times 10^{-36} / [\text{Fe}^{3+}]$$

$$[\text{Fe}^{3+}] = 1.5 \text{ mmol L}^{-1}$$

$$[\text{OH}^{-}]^3 = 1.0 \times 10^{-36} / 1.5 \times 10^{-3}$$

$$[\text{OH}^{-}]^3 = 0.6667 \times 10^{-33}$$

$$\therefore 3 \log[\text{OH}^{-}] = \log 0.6667 - 33$$

$$\therefore \log[\text{OH}^{-}] = -10.94$$

$$\therefore \text{pOH} = 10.94$$

$$\therefore \text{pH} = 3.06 \quad \dots \textcircled{1}$$

したがって、①より、pH3.0 を超えると Fe³⁺は Fe(OH)₃ を形成し始めるため、N₂O としての回収率が低下したものと考えられ、Fig.3-5 に示す結果の妥当性が支持される。

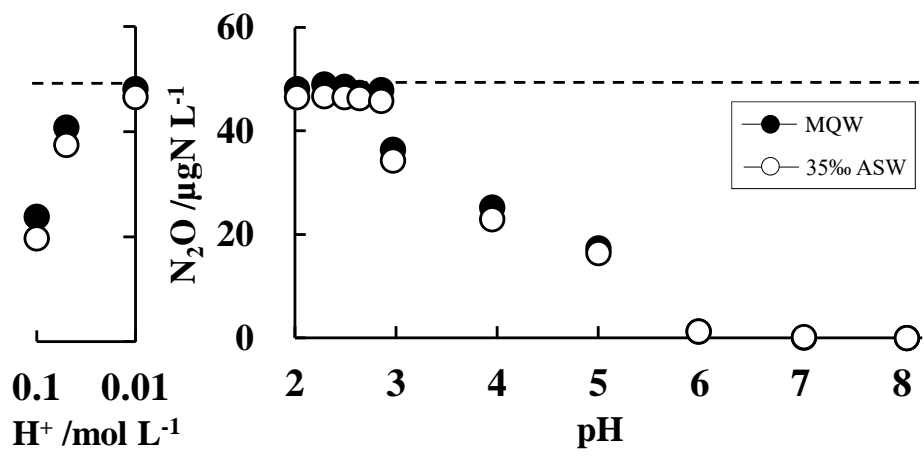


Fig. 3-5 pH による影響 ($\text{NH}_2\text{OH } 50 \mu\text{gN L}^{-1}$)



Fig. 3-6 $\text{Fe}(\text{OH})_3$ の形成

pH の調製

塩化鉄溶液の添加後の最適 pH が pH 2.00~2.85 であった (Fig.3-5)。そこで、試料水の pH を最適 pH に調整するためには、Butler et al. (1986) が使用した酢酸緩衝液 (pH 3.2~6.2) ではこの最適 pH の範囲内に調整することができないため、pH 2.00~2.85 に調整可能なクロロ酢酸-水酸化カリウム緩衝溶液(pH 2.35~2.5)を選択した。そこで、この緩衝溶液の最適添加量を検討するため次の実験を行った。70 mL バイアル瓶に MQW または ASW で満たし、ブチルゴムとアルミキャップで密閉し、 NH_2OH が $50 \mu\text{gN L}^{-1}$ になるように添加した(Fig. 3-7)。その後、クロロ酢酸-水酸化カリウム緩衝溶液を 0.5~3.0 mL の範囲で添加し、 105 mmol L^{-1} 塩化鉄溶液を 1.0 mL 添加した。気液平衡後の N_2O を測定した結果、MQW と ASW とともに緩衝溶液の添加量が 0.5 mL から 3.0 mL の範囲において、 N_2O は一定となり、回収率はほぼ 100%であった(Fig. 3-8)。また、MQW と ASW で回収率に大きな差は見られないことから、本法の最適 pH を MQW と ASW とともにクロロ酢酸-水酸化カリウム緩衝溶液の添加量は、安全をみて 1.0 mL と判断した。

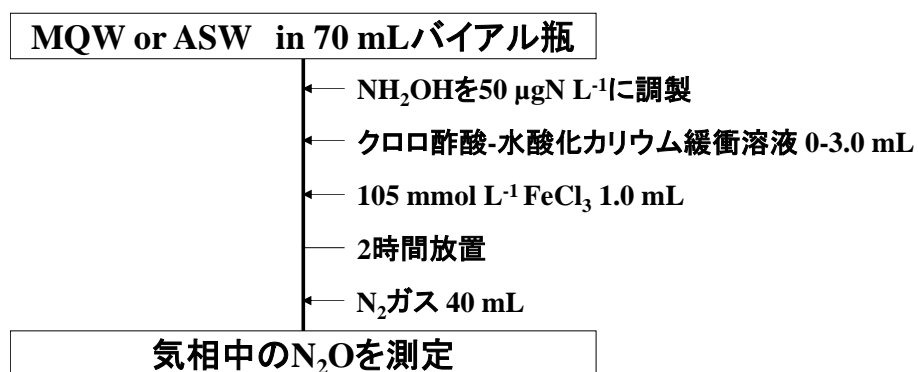


Fig. 3-7 pH 調整の操作方法

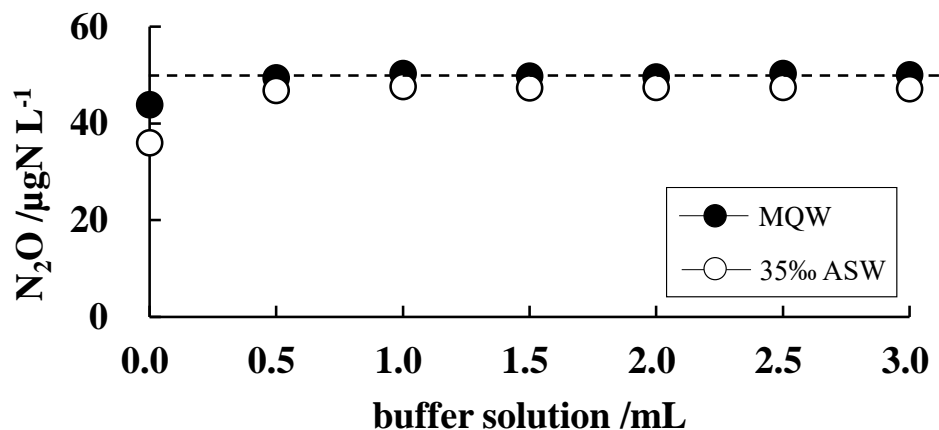


Fig. 3-8 緩衝溶液の最適添加量 (NH_2OH $50 \mu\text{gN L}^{-1}$)

Fe^{3+} の最適濃度

次に、 NH_2OH を N_2O へ酸化するための Fe^{3+} 溶液の最適濃度の検討を行った。まず、MQW または ASW で 70 mL バイアル瓶を満たし、ブチルゴムとアルミキャップで密閉し、 NH_2OH が 20 及び $50 \mu\text{gN L}^{-1}$ になるように添加した(Fig. 3-9)。その後、クロロ酢酸－水酸化カリウム緩衝溶液を 1.0 mL 添加し pH を pH2.35-2.5 に調製した。そのバイアル瓶に対し、塩化鉄溶液の濃度が $0\sim 175 \text{ mmol L}^{-1}$ に調製した溶液を、それぞれ 1.0 mL 添加した(添加後の最終濃度 $0\sim 2.5 \text{ mmol L}^{-1}$)。2 時間放置後、気液平衡後の N_2O を測定した結果、 Fe^{3+} 溶液添加後の最終濃度が 1.2 mmol L^{-1} から少なくとも 2.5 mmol L^{-1} まで、 N_2O は一定となり回収率はおおよそ 100%であった(Fig. 3-10)。また、MQW と ASW で回収率に大きな差が見られないことから、本法における Fe^{3+} の最適最終濃度は MQW と ASW ともに 1.5 mmol L^{-1} であると判断し、70 mL のサンプルに対して 105 mmol L^{-1} 塩化鉄溶液を 1.0 mL 添加することとした。

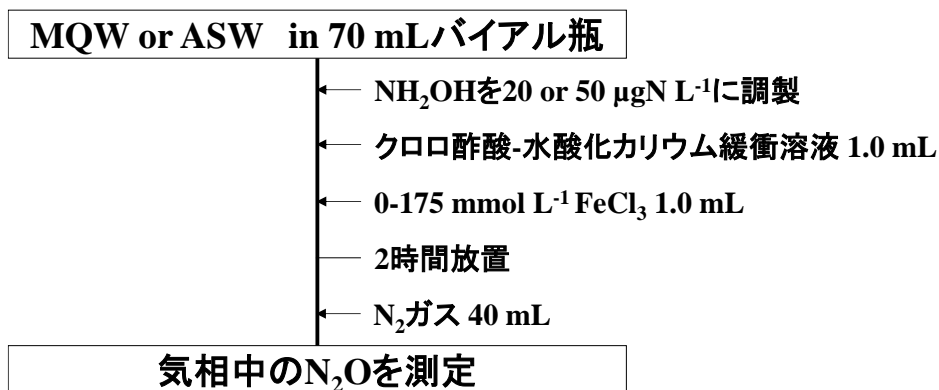


Fig. 3-9 Fe³⁺の最適添加量の操作方法

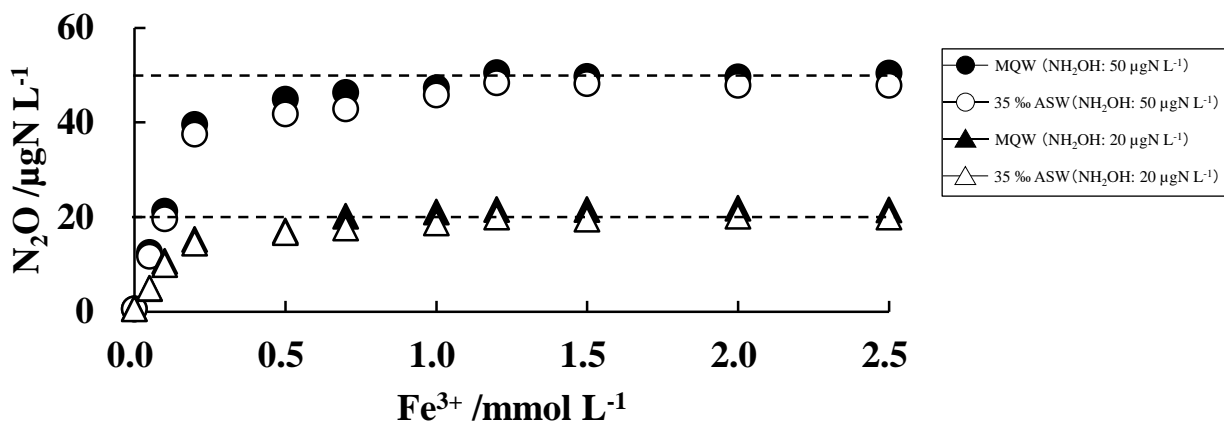


Fig. 3-10 Fe³⁺の最適添加量

放置時間（反応時間）

次に、Fe³⁺添加後の放置時間に関する検討を行った。まず、70 mL バイアル瓶を MQW または ASW で満たし、ブチルゴムとアルミキャップで密閉後、NH₂OH が 50 μgN L⁻¹ になるように添加した(Fig. 3-11)。そこに、クロロ酢酸-水酸化カリウム緩衝溶液を 1.0 mL と 105 mmol L⁻¹ 塩化鉄溶液を 1.0 mL 添加した。その後、0~10 日の範囲で放置し、気液平衡後の N₂O を測定した。その結果、回収率は MQW と ASW とともに塩化鉄溶液を添加した 1 時間後にほぼ 100%と最大に達し、それ以降値にほとんど変化はなかった(Fig. 3-12)。

したがって、本法における Fe^{3+} 添加後の放置時間は、MQW と ASW とともに安全をみて 2 時間とした。また、生成した N_2O は少なくとも 10 日間は安定であることもわかった。

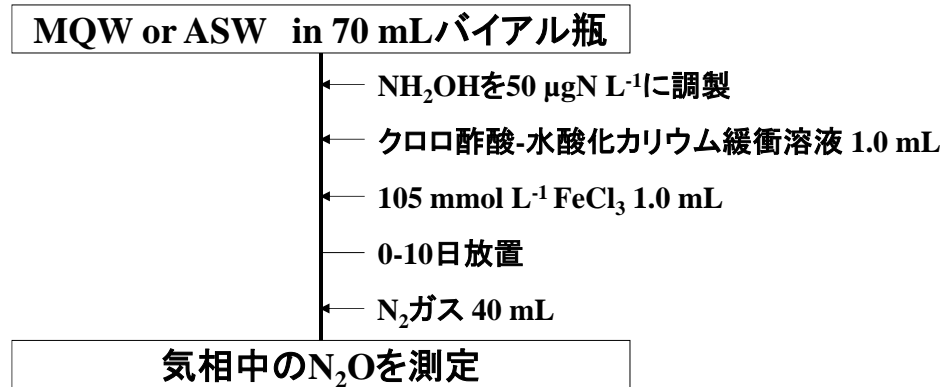


Fig. 3-11 Fe^{3+} 添加後の放置時間の操作方法

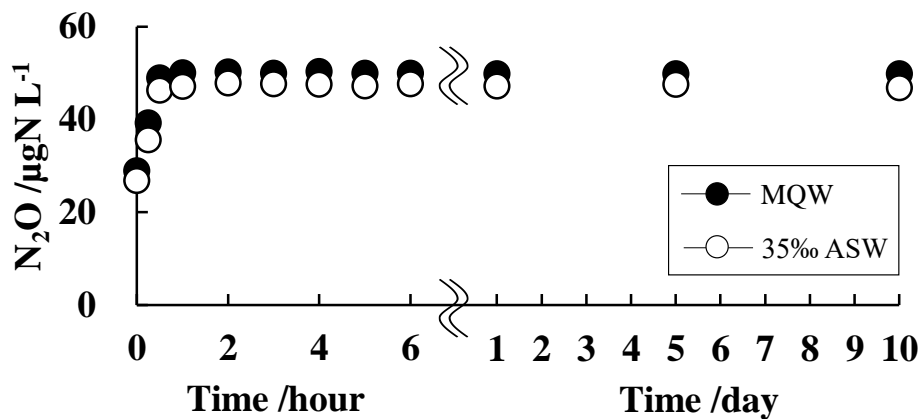


Fig. 3-12 Fe^{3+} 添加後の放置時間

共存物質の影響

環境水中において、窒素化学種は NH_2OH の他に NH_4^+ , NO_2^- , NO_3^- ; 尿素やアミノ酸が存在する。そこで、 Fe^{3+} と NH_4^+ , NO_2^- , NO_3^- ; 尿素と 5 種のアミノ酸（グリシン、グルタミン酸、フェニルアラニン、アラニン、リシン）が共存した際の影響の有無を確認するため、次の実験を行った。70 mL バイアル瓶に MQW を満たし、ブチルゴムとアルミキャップで密閉し、 NH_4^+ , NO_2^- 及び NO_3^- は $1000 \mu\text{gN L}^{-1}$ に、尿素とアミノ酸については 100

$\mu\text{gN L}^{-1}$ になるようにそれぞれ添加した(Fig. 3-13)。さらに、 NH_2OH が $50 \mu\text{gN L}^{-1}$ になるように添加した。そこに、クロロ酢酸-水酸化カリウム緩衝溶液を 1.0 mL と 105 mmol L^{-1} 塩化鉄溶液を 1.0 mL 添加した。2 時間放置後、 N_2 ガスで気相を作成し、気液平衡後の N_2O を測定した。その結果、 N_2O としての回収率が NH_4^+ , NO_2^- , NO_3^- , 尿素と 5 種のアミノ酸を添加してもほぼ 100% 得られたことから、 NH_4^+ , NO_2^- 及び NO_3^- は $1000 \mu\text{gN L}^{-1}$ で、尿素とアミノ酸については $100 \mu\text{gN L}^{-1}$ では影響を受けないことがわかった(Table 3-2)。したがって、一般的な環境水中濃度からみて、これらの物質の影響はほとんどないものと判断した。

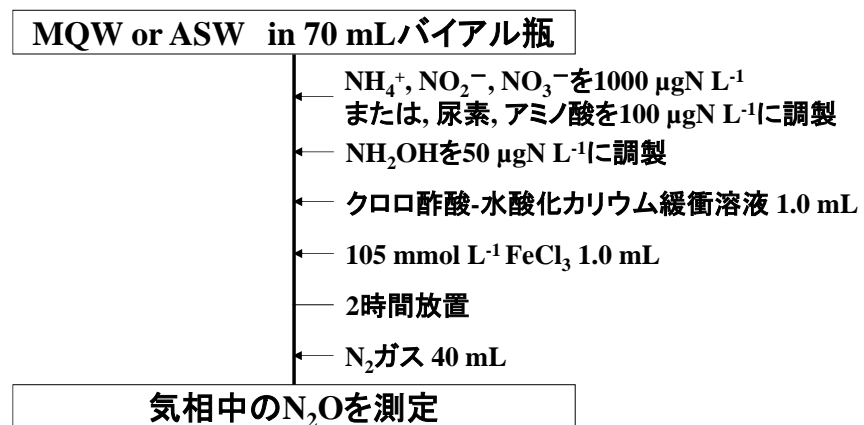


Fig. 3-13 NH_4^+ , NO_2^- , NO_3^- , アミノ酸及び尿素による影響の操作方法

Table 3-2 NH₄⁺, NO₂⁻, NO₃⁻, アミノ酸及び尿素による影響

Sample ^a	Found/ μgN L ⁻¹	Recovery/ %	RSD(n=3) %
NH ₂ OH (50) only	49.5	99.0	0.7
ammonium (1,000) + NH ₂ OH (50)	49.8	99.7	0.1
nitrite (1,000) + NH ₂ OH (50)	49.5	99.0	0.8
nitrate (1,000) + NH ₂ OH (50)	49.7	99.4	0.7
Glycine (100) + NH ₂ OH (50)	49.2	98.4	0.2
L-Glutamic acid (100) + NH ₂ OH (50)	49.5	99.1	0.3
L-Phenylalanine (100) + NH ₂ OH (50)	49.3	98.5	0.5
L-α-Alanine (100) + NH ₂ OH (50)	49.3	98.7	0.2
L-Lysine monohydrochloride (100) + NH ₂ OH (50)	49.5	99.1	0.5
Urea (100) + NH ₂ OH (50)	49.5	99.0	0.4

a. ()中の単位はすべて μgN L⁻¹である

プランクトンの影響

有機物（特に植物プランクトン）を多く含むサンプルに対し次亜塩素酸を添加すると、次亜塩素酸と有機物が化学反応し、次亜塩素酸ナトリウムの不足による NH₂OH の過小評価が懸念された（第2章参照）。そこで、各濃度に調製した植物プランクトンを含む溶液中（Chl-*a*: 0~160 μg L⁻¹）の NH₂OH を本法と次亜塩素酸法でそれぞれ測定した。Chl-*a* を 0~160 μg L⁻¹ の範囲で調製した試料を 70 mL バイアル瓶に満たし、ブチルゴムとアルミキャップで密閉し、NH₂OH が 50 μgN L⁻¹ になるようにそれぞれに添加した(Fig. 3-14)。そこに、クロロ酢酸-水酸化カリウム緩衝溶液を 1.0 mL と 105 mmol L⁻¹ 塩化鉄溶液を 1.0 mL 添加した。2 時間放置後、N₂ ガスで気相を作成し、気液平衡後の N₂O を

測定した。その結果、次亜塩素酸法では植物プランクトンの指標となる Chl-*a* の増加に伴い回収される N₂O が減少したのに対し、本法では Chl-*a* が増加しても、回収された N₂O は 100%と一定であった(Fig. 3-15)。このことから、次亜塩素酸法は植物プランクトン由来の有機物が多い水域においては、NH₂OH が過小評価されるため適用に注意を要することが分かった。一方、本法は植物プランクトン由来の有機物が多い水域においても、有機物の影響を受けることなく適用可能であることがわかった。

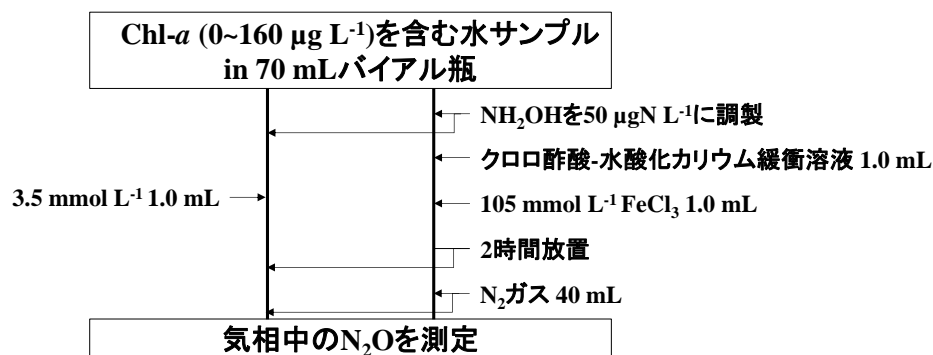


Fig. 3-14 次亜塩素酸法と Fe³⁺法における Chl-*a* の影響の操作方法

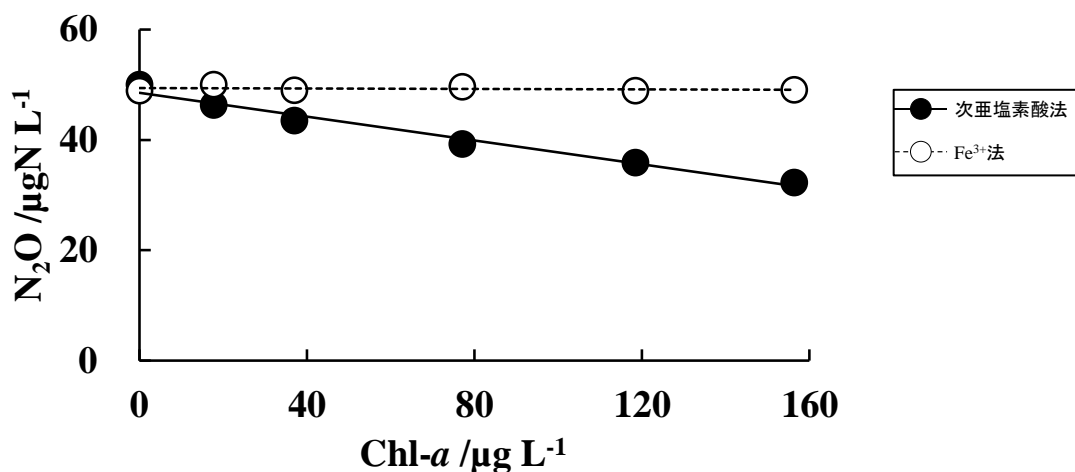


Fig. 3-15 次亜塩素酸法と Fe³⁺法における Chl-*a* の影響 (NH₂OH 50 µg N L⁻¹)

実サンプルを用いた回収率と再現性

本法が淡水及び汽水サンプルにおいて適用可能かどうかを確認するため斐伊川、宍道湖及び中海のサンプルを用いて検討を行った。北原式採水器（離合社 リゴ- B 号透明採水器）を用いて斐伊川、宍道湖及び中海の試料を採取した。その水を 70 mL バイアル瓶に満たし、ブチルゴムとアルミキャップで密閉後、 NH_2OH が 20 及び 50 $\mu\text{gN L}^{-1}$ になるようにそれぞれ添加し、そこに、クロロ酢酸-水酸化カリウム緩衝溶液を 1.0 mL と 105 mmol L^{-1} 塩化鉄溶液を 1.0 mL それぞれ添加した (Fig. 3-16)。2 時間放置後、 N_2 ガスで気相を作成し、気液平衡後の N_2O を測定した。その結果、回収された N_2O は斐伊川、宍道湖及び中海のすべての地点のいずれの濃度においてもほぼ 100% であり、相対標準偏差 (RSD) も 1.1-2.1% とばらつきも小さかった (Table 3-3)。以上の結果から、本法は、淡水、汽水及び海水に適用可能であると判断した。

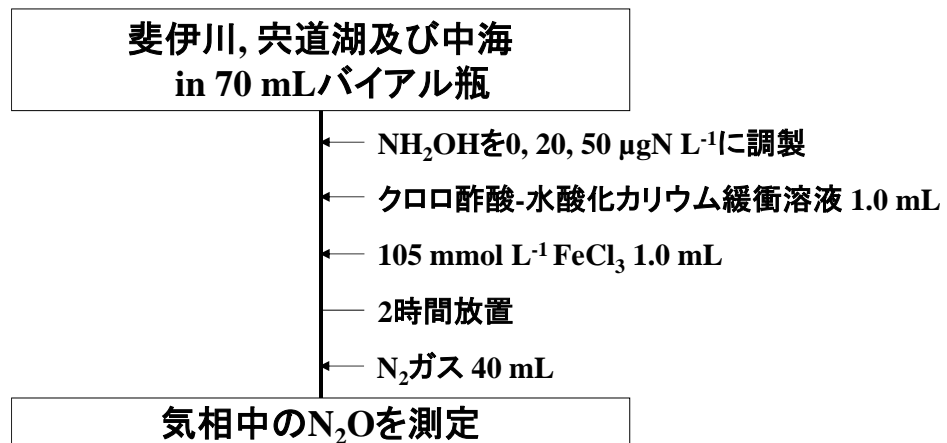


Fig. 3-16 添加回収実験の操作方法

Table 3-3 添加回収実験

Sample	Added/ $\mu\text{gN L}^{-1}$	Found/ $\mu\text{gN L}^{-1}$	Recovery/		RSD ($n=5$)/
			$\mu\text{gN L}^{-1}$	%	%
Hii river (Freshwater)	0	0.6	—	—	—
	20	21.3	20.6	103	2.1
	50	51.5	50.9	102	2.1
Lake Shinji (Salinity, 8.0 ‰)	0	0.4	—	—	—
	20	20.2	19.8	99	1.3
	50	50.9	50.6	101	1.2
Lake Nakaumi (Salinity, 24.8 ‰)	0	0.6	—	—	—
	20	20.5	19.9	99	2.1
	50	51.4	50.9	102	1.1

まとめ

本研究において, Breymann et al. (1982) や Butler et al. (1986) の方法をもとに, Fe^{3+} を用いた NH_2OH の定量法の改良を行った。本法では, クロロ酢酸-水酸化カリウム緩衝溶液と塩化鉄溶液を添加することで NH_2OH を N_2O に定量的に酸化し, その N_2O を ECD-GC を用いてヘッドスペース法にて定量した。本法は, 既存の NH_2OH の定量法である次亜塩素酸法と同様に淡水, 汽水及び海水サンプルに適用可能であり, 加えて次亜塩素酸法に比べアオコや赤潮などの植物プランクトンのような有機物が多い水域でも有機物の影響を受けない定量法である。なぜなら, 酸化還元反応の標準電極電位 E_0 が次亜塩素酸は 1.63 V であるのに対し, Fe^{3+} は 0.77 V と Fe^{3+} の方が低いことから, Fe^{3+} の酸化力は小さいため有機物の影響を受け難いものと考えられる。本法を斐伊川及び宍道湖, 中海のサンプルに適用したところ, 高い回収率と再現性が認められた。以上のことから, 本法は幅広い水域において適用可能な NH_2OH の定量法として有用な方法と言える。

第 4 章 三瓶ダム表層における NH_2OH の発生及び植物プランクトンに由来する NH_2OH の生成・放出

はじめに

近年、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 (Lomas M. W. et al., 2006; 武田, 2016), この原因が、鉄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放出にあることが報告されている (武田, 2016)。一方で、植物プランクトンの窒素代謝による亜硝酸塩以外の窒素化学種が生成・放出されるという報告はない。しかしながら、第 2 章で述べたように布部ダムにおいて、これまでの知見では表層水 (0 m および 1 m) において生成される可能性が低いと考えられる NH_2OH が、高濃度で検出されるという現象を見出した。さらに、この NH_2OH には *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。この結果より、夏季において表層で検出される NH_2OH は、植物プランクトンに由来する可能性が示唆された。しかしながら、 NH_2OH が高濃度で検出された際の植物プランクトンの種類の判別や植物プランクトンが実際に NH_2OH を生成・放出するかどうかについては検証が不十分であった。

そこで本研究では、島根県中部に位置する三瓶ダムにおける夏季の 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。また、 NH_2OH の定量には、酸化剤に次亜塩素酸塩を用いる従来法は、酸化力が強いいため、本研究のように有機物 (植物プランクトン) を多く含むサンプルを対象とする場合、 NH_2OH の定量値が過小評価されたため、酸化剤として Fe^{3+} を用いる本論文第 3 章の手法を使用した。また、三瓶ダムと宍道湖で採取した植物プランクトンの単離培養株 (無菌株) を用いて、室内培養実験で植物プランクトンの NH_2OH 生成能について検討した。

材料と方法

調査地点

三瓶ダムは、島根県三瓶川の中流に位置し、洪水調節、河川環境の保全、および水道用水の供給のために利用される多目的ダムである。また、このダム湖は1年を通して水深が変化するため、深度ではなく標高 (EL: Elevation) で示している。フィールド調査は、島根県の中部に位置する三瓶ダム (35°10'19"N, 132°33'31"E) の3地点 (Fig. 4-1)において、月1回の頻度で行った。このダム湖は、布部ダムと同様に富栄養化しており、夏の初めから秋にかけて深水層が無酸素化する。また、近年では夏季にアオコが毎年確認されている。

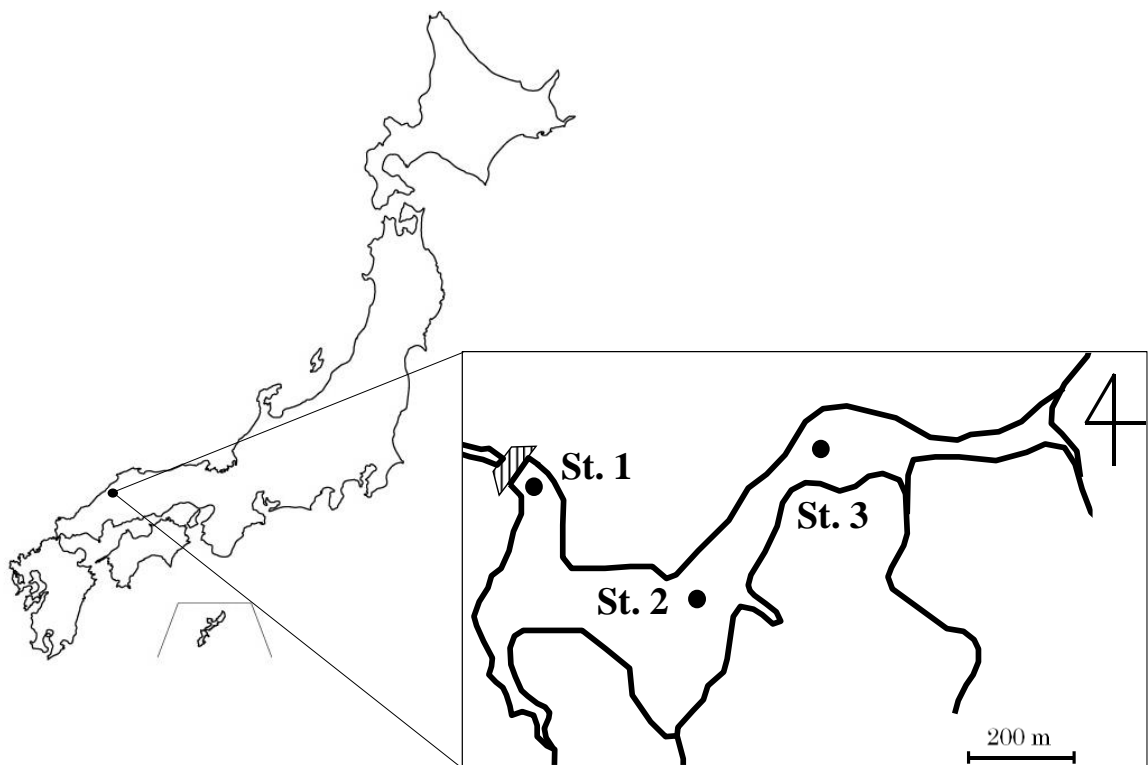


Fig. 4-1 三瓶ダムにおける調査地点

調査方法

N_2O と NH_2OH の定量用サンプルの採水は北原式採水器（離合社 リゴ-B 号透明採水器）を用いて行い、70 mL バイアル瓶に試料水を満たしブチルゴムとアルミシールを用いて密封した。 N_2O 定量用バイアル瓶にはホルマリン 1.0 mL を添加し定量試料とした。 NH_2OH 定量用バイアル瓶には、クロロ酢酸-水酸化カリウム緩衝液 1.0 mL を添加し、次いで NH_2OH を N_2O に酸化するため 105 mmol L⁻¹ 塩化鉄(III)溶液 1.0 mL を添加し、 NH_2OH の試料に供した。また、 NH_4^+ 、 NO_2^- 、 NO_3^- 定量用試料水をポリ瓶に採取し、ガラスフィルター（Whatman GF/C、粒子保持能 1.2 μm ）を用いてろ過を行い、ろ過後のろ紙は Chl-*a* の試料に供した。 NH_4^+ 、 NO_2^- 、 NO_3^- については、ろ過水を実験室に持ち帰った後、すぐに分析を行った。また水中の水温、溶存酸素 (DO)、酸化還元電位 (ORP)、濁度(Turb)及び pH は、多項目水質計 (Hydrolab HL7) を用いて現場にて測定した。

試薬

N_2O 、 NH_2OH の定量

NH_2OH 標準液 (500 mgN L⁻¹) は、塩化ヒドロキシルアンモニウム（富士フィルム和光純薬、特級）を 0.2481g 秤量後、窒素置換した MQW で溶かし 100 mL とした。これを使用時に窒素置換 MQW で適宜希釈して使用した。この標準溶液は使用の度に調製した。

N_2O 標準ガスは、純 N_2O ガス (99.5%、ジャパンファインプロダクツ)を使用した。

N_2 ガスは、純窒素(純度 99.99995%以上、ジャパンファインプロダクツ)を使用した。

ホルムアルデヒド溶液は、ホルムアルデヒド(富士フィルム和光純薬、特級)を使用した。

塩化鉄(III)溶液 (105 mmol L^{-1}) は、塩化鉄(III)6水和物 (富士フィルム和光純薬, 特級) 2.838 g を 100 mL の水に溶かし調製した。

クロロ酢酸-水酸化カリウム緩衝液は、13.22 g のクロロ酢酸 (富士フィルム和光純薬, 特級) と 1.692 g の水酸化カリウム (富士フィルム和光純薬, 特級) を 100 mL の水に溶かし調製した。

NH_4^+ の定量

NH_4^+ 標準溶液 (1000 mgN L^{-1})は、 110°C で4~24時間乾燥した塩化アンモニウム (富士フィルム和光純薬, 特級) 0.3819 g を MQW に溶かし、1000 mL とした。

ニトロプルシッドナトリウム溶液は、ニトロプルシッドナトリウム (富士フィルム和光純薬, 特級) 1 g を MQW に溶かし 100 mL とし、着色ガラス瓶に入れ、冷暗所で保存した。この溶液は月に一度作り替えた。

フェノール溶液は、フェノール溶液 (富士フィルム和光純薬, 特級) 10 g にエタノール (富士フィルム和光純薬, 特級) 10 mL を加えて完全に溶かし、MQW で 100 mL とし、着色ガラス瓶に入れ、冷暗所で保存した。この溶液は月に一度作り替えた。

アンチホルミン溶液 (次亜塩素酸ナトリウム溶液：有効塩素量 0.08~0.11 w/v%)は、次亜塩素酸ナトリウム溶液 (関東化学, 鹿一級) 10 mL に 2.5%水酸化ナトリウム溶液 (富士フィルム和光純薬, 特級) を 20 mL 加え、MQW で 100 mL とした。この混合溶液は使用の度に調製した。

NO₂⁻の定量

NO₂⁻標準溶液 (100 mgN L⁻¹)は、110 °Cで4時間乾燥させた亜硝酸ナトリウム (富士フィルム和光純薬, 特級) をデシケーターで放冷後、0.1231 g をイオン交換水で正確に 250 mL とした。これを褐色瓶に入れ冷暗所で保管し、1 ヶ月ごとに調製し直した。また、使用時に適宜希釈して用いた。

スルファニルアミド溶液は、スルファニルアミド (富士フィルム和光純薬, 特級) 2 g を塩酸 (富士フィルム和光純薬, 特級) 20 mL に溶かしイオン交換水で 200 mL とした。これを褐色瓶に入れ冷暗所で保管し、1 ヶ月ごとに調製し直した。

ナフチルエチレンジアミン溶液は、*N*-(1-ナフチル) エチレンジアミン二塩酸塩 (富士フィルム和光純薬, 特級) 0.2 g をイオン交換水に溶かし 200 mL とした。これを褐色瓶に入れ冷暗所で保管し、1 ヶ月ごとに調製し直した。

NO₃⁻の定量

NO₃⁻標準溶液 (100 mgN L⁻¹)は、110 °Cで4時間乾燥させた硝酸カリウム (富士フィルム和光純薬, 特級) をデシケーターで放冷後、0.1805 g をイオン交換水で正確に 250 mL とした。これを褐色瓶に入れ冷暗所で保管し、1 ヶ月ごとに調製し直した。また、使用時に適宜希釈して用いた。

NO₂⁻標準溶液 (100 mgN L⁻¹)は、110 °Cで4時間乾燥させた亜硝酸ナトリウム (富士フィルム和光純薬, 特級) をデシケーターで放冷後、0.1231 g をイオン交換水で正確に 250 mL とした。これを褐色瓶に入れ冷暗所で保管し、1 ヶ月ごとに調製し直した。また、使用時に適宜希釈して用いた。

カドミウムは、カドミウム小片 (富士フィルム和光純薬, 特級 硝酸測定用)を使用した。

0.24 mol L⁻¹ 塩酸は、イオン交換水に濃塩酸 (富士フイルム和光純薬, 特級) 10 mL を加え、イオン交換水で全量を 500 mL とした。

0.3 mol L⁻¹ 硝酸は、イオン交換水に濃硝酸 (富士フイルム和光純薬, 特級) 10 mL を加え、イオン交換水で全量を 500 mL とした。

conc.塩化アンモニウム溶液は、塩化アンモニウム (富士フイルム和光純薬, 特級) 25 g をイオン交換水 100mL に溶解した。

dil.塩化アンモニウム溶液は、conc.塩化アンモニウム溶液 25 mL をイオン交換水で 1000 mL とした。

2%硫酸銅溶液は、硫酸銅五水和物 (富士フイルム和光純薬, 特級) 10 g をイオン交換水に溶かし 500 mL とした。

スルファニルアミド溶液は、スルファニルアミド (富士フイルム和光純薬, 特級) 2 g を塩酸 (富士フイルム和光純薬, 特級) 20 mL に溶かしイオン交換水で 200 mL とした。これを褐色瓶に入れ冷暗所で保管し、1 ヶ月ごとに調製し直した。

ナフチルエチレンジアミン溶液は、N-(1-ナフチル) エチレンジアミン二塩酸塩 (富士フイルム和光純薬, 特級) 0.2 g をイオン交換水に溶かし 200 mL とした。これを褐色瓶に入れ冷暗所で保管し、1 ヶ月ごとに調製し直した。

Chl-a の定量 (すりつぶし法)

90%アセトン溶液は、アセトン(富士フイルム和光純薬, 特級) 900 mL にイオン交換水 100 mL を加え、着色ガラス瓶に保存した。

化学分析

N₂O 及び NH₂OH の分析には ECD-GC (Shimazu GC-14B) を用い、カラムは Unibeats C (Mesh 80/100) を充填したステンレスカラム (長さ : 2 m, 内径 : 2.6 mm) を使用した。キャリアガスには、高純度 N₂ ガス (>99.99995%) を用い、流速 50 mL min⁻¹ で使用した。注入口と検出器の温度は 200°C と 300°C に、カラム温度は 130°C にそれぞれ設定した。

N₂O の定量は、N₂ ガスで気相を作成し気相中の N₂O を ECD-GC で測定し、液相中の N₂O 濃度は Weiss and Price (1980) の式を用いて算出した。NH₂OH は第 3 章の定量法により測定した。

NH₄⁺, NO₂⁻ 及び NO₃⁻ 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 & Robinson, 1952), 及び Cd-Cu アマルガム-ナフチルエチレンジアミン法(Wood et al., 1967)によりそれぞれ定量した。Chl-*a* は, Parsons T. and Strickland J. (1963)及び SCOR/UNESCO 法(UNESCO, 1966)により定量した。これらは吸光光度計 (Shimadzu UV-1800-type) を用いて測定した。また, pH は pH メーター (Horiba F-23) を用いて測定した。

N₂O 及び NH₂OH の定量方法

N₂O または NH₂OH 標準溶液を脱酸素水で希釈し 50 mgN L⁻¹, 5 mgN L⁻¹, 500 µgN L⁻¹, および 100 µgN L⁻¹ に調製した。褐色バイアル瓶(70 mL)にガラスビーズを 1 個入れ、窒素置換した MQW で満たしアルミキャップとブチルゴムで密封後、標準溶液をイトーマイクロシリンジ(1 mL)で既定量添加し検量線とした。

現場では、NH₂OH 定量用の褐色バイアル瓶 (70 mL)と N₂O 定量用の透明バイアル瓶 (70 mL)に試料水を満たして密封し、NH₂OH 定量用バイアル瓶にはクロロ酢酸-水酸化

カリウム緩衝液 1.0 mL と 105 mmol L⁻¹ 塩化鉄(III)溶液 1.0 mL を添加し攪拌した。N₂O 定量用バイアル瓶にはホルマリン 1.0 mL を添加し攪拌した。その後、実験室に持ち帰り NH₂OH, N₂O 定量用バイアル瓶共に、窒素ガスを 40 mL 注入してヘッドスペースを作り、攪拌して気液平衡の状態にし、ECD-GC にヘッドスペースの気相を 0.2 mL 注入し測定した(Fig. 4-2)。ECD-GC (Shimadzu GC-14B) のカラムは Unibeads C (Mesh 80/100) を充填したステンレスカラム (長さ : 2 m, 内径 : 2.6 mm) を使用した。また, CaSO₄ (ドライライト) を充填したガラスカラム (長さ : 8 cm, 内径 : 7 mm) を試料中の H₂O 吸収プレカラムとして用いた。キャリアガスには, 高純度 N₂ ガス (>99.99995%) を用い, 流速 50 mL min⁻¹ で使用した。注入口と検出器の温度は 200 °C と 300 °C に, カラム温度は 130 °C にそれぞれ設定した。本法の定量下限は 0.2 μg N L⁻¹ で保持時間は 7 分であった。NH₂OH および N₂O の定量は, 上記の通りヘッドスペース法を用いて行った。気相中の N₂O 濃度は上記のガスクロマトグラフで測定し, 液相中の N₂O 濃度は Weiss and Price (1980) の式を用いて算出した。NH₂OH は N₂O のピークエリアの値を引いた数値を用いて検量線から求めた。

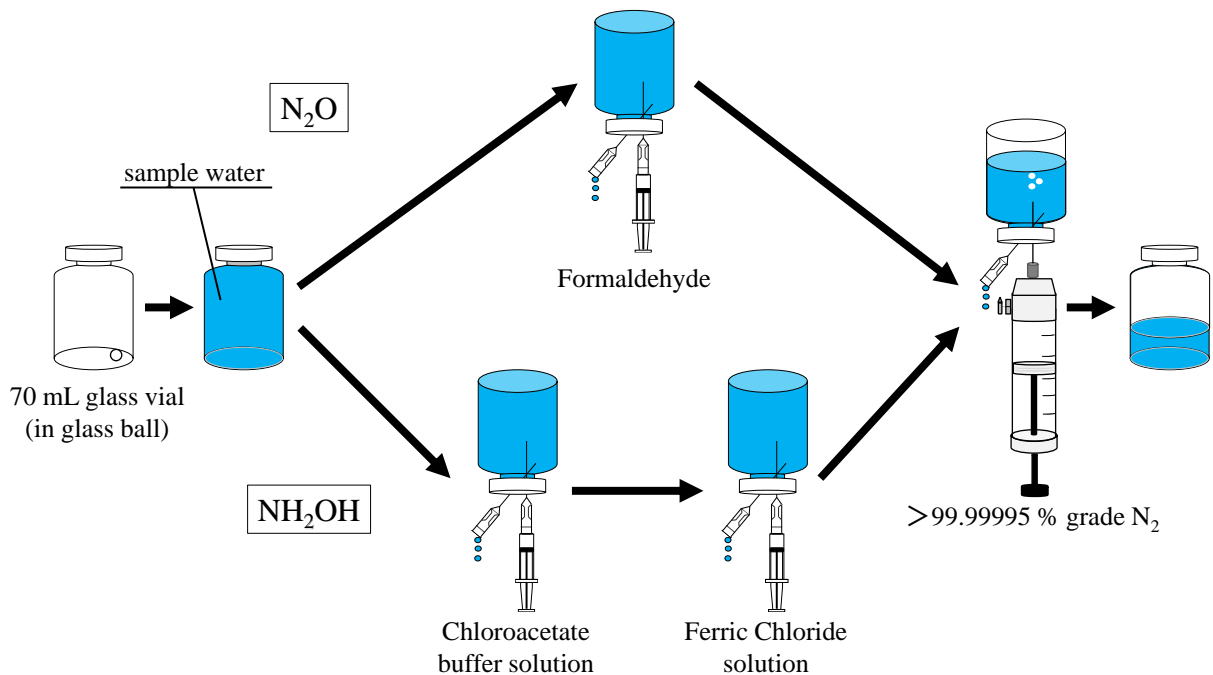


Fig. 4-2 Fe³⁺を用いる NH₂OH 及び N₂O の標準定量操作

植物プランクトンの形態観察と同定

試料水は、採水後速やかに、次の方法により濃縮を行った後検鏡した。試料水 200 mL を口径 0.45 μm のメンブランフィルターにより緩やかに吸引ろ過した後、フィルター表面に集積した植物プランクトンをミクロスパーテルを用いてかきとり、試料水約 1.5 mL でサンプルチューブに流し込み、さらに試料水で 2 mL にまでメスアップし、100 倍濃縮試料とした。さらに、100 倍濃縮試料に 2.5% グルタルアルデヒド約 2 mL を加えて固定試料とした。検鏡時には、固定試料の上澄みを捨て、沈殿した試料を 5% ホルマリンを用いて全量が 2 mL になるように調整して 100 倍濃縮試料を作成し検鏡に供した（野尻ら, 2019）。

検鏡は光学顕微鏡（Olympus BX60, Japan）を用い、400 倍と 1000 倍の倍率で行った。群体もしくは細胞の大きさを計測する際は、1000 倍の倍率で対物マイクロメータを用いて、各々の試料から無作為に 10 以上の対象物を選んで測定を行った。

室内培養実験及び無菌株の作成

ラン藻の培養には CA 培地（Ichimura et al., 1974）を用いた。300 mL の三角フラスコに CA 250 mL を満たし、オートクレーブ（121°C, 20 分）を用いて滅菌したものを使用した。これに 10 mL の培養株を添加し、卓上型人工気象器（NK system, LH-60FL12-DT）にて 12 時間明暗周期（1300~1350 lx）, 20°C の条件下で本培養を行った。

NH_2OH の生成の有無の検証には次の 2 種のラン藻の培養株を用いた。1 種は、三瓶ダムにてアオコが発生し、かつ表水層で高濃度の NH_2OH が検出された際に確認されたラン藻に属する *Dolichospermum crassum* を用いた。他の 1 種については、比較のため、アオコは形成しないもののラン藻に属する *Coelosphaerium* sp. を用いた。これらの培養株については、それぞれ三瓶ダム及び宍道湖から単離したものを使用し、細菌による NH_2OH の生成を排除するため無菌化した。

ラン藻の培養株は、実体顕微鏡下で滅菌済みパスツールピペット (Godo et al., 2017; Hayashi et al., 2019) を使用したピペット洗浄法 (Pringsheim, 1946) により試験水から 1 群体取り出し、滅菌済みの CA 培地で洗浄した後、培養試験管に移し 20°C、照度 1500~1600 lx (12 時間 : 12 時間明暗周期) の条件で培養した。無菌化の確認については、培養株をエチジウムブロマイドによる染色後、蛍光顕微鏡 (Olympus BX51, Japan) を用いて紫外線照射下 (450~490 nm) で観察し (染谷ら, 2003; Someya, 1995), ラン藻の細胞以外の細胞が見られない場合、無菌と判断した。無菌株となるまで、この操作を繰り返した。

結果と考察

三瓶ダムにおける窒素化学種の鉛直分布

Fig.4-3 に三瓶ダムにおける 2019 年 7 月 30 日と 9 月 25 日の窒素化学種及び Chl-*a* の鉛直分布を示した。NH₂OH は、いずれも表水層で高濃度に検出され、2019 年 7 月 30 日と 9 月 25 日の値はそれぞれ 6.7~8.0 μgN L⁻¹ と 5.2~6.2 μgN L⁻¹ であった。NH₂OH は一般に硝化反応及び Anammox 反応の中間体として生成されることが知られている。しかしながら表層では、硝化反応は光阻害を、Anammox 反応は酸素阻害を受けるため、これらの反応による可能性は低いと考えられる。高濃度の NH₂OH は特に植物プランクトンの生産層で検出されており、この時、Chl-*a* は 7 月 30 日と 9 月 25 日でそれぞれ 20.5~21.9 μg L⁻¹, 38.0~45.3 μg L⁻¹ と高濃度であった。このことから、この表層における NH₂OH の生成は、硝化反応、硝酸還元反応、Anammox 反応のいずれでもなく、植物プランクトン由来である可能性が示唆された。

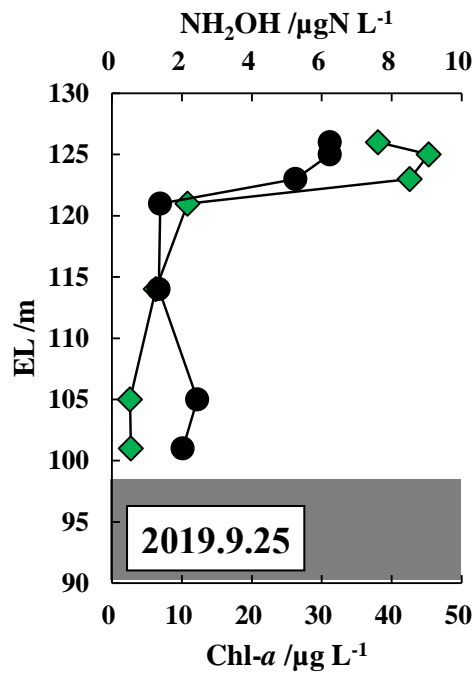
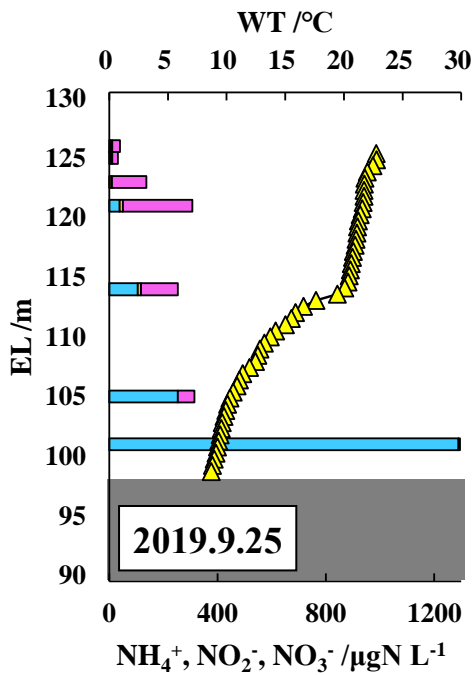
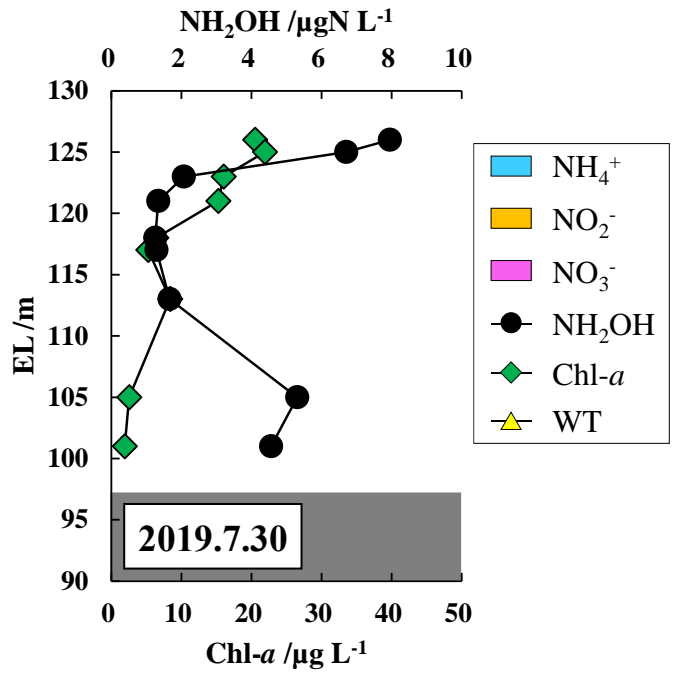
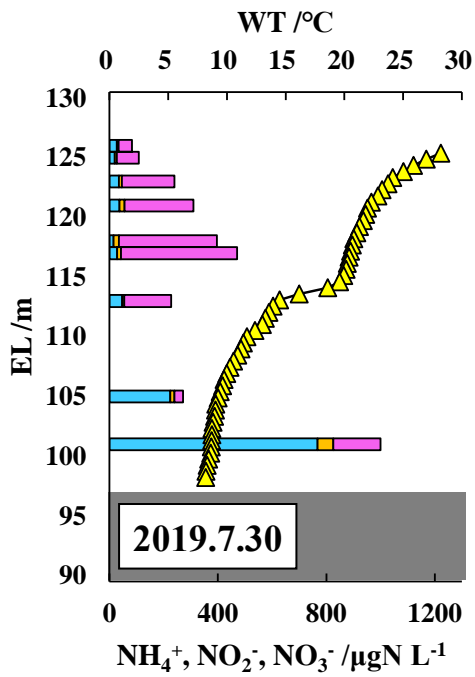


Fig. 4-3 三瓶ダムにおける窒素化学種及び Chl-*a* の鉛直分布

三瓶ダムにおいて発生する植物プランクトン種について

三瓶ダムにおいて発生する植物プランクトンの種類について、2019年6月から10月のフィールド調査時に同定を行った。また、植物プランクトンの種類の同定については、島根大学教育学部教授 大谷先生の協力により行った。その結果、6月の優占種は藍藻 *Dolichospermum planctonicum*, 7月は珪藻 *Ulnaria japonica*, 9月は藍藻 *Aphanizomenon cf. flos-aquae*, 10月は藍藻 *Geitlerinema sp.*であった。このように調査するごとに優占種は異なっていた。また、優占種の他に、藍藻：*Microcystis sp.*, *Pseudanbaena sp.*, *Dolichospermum crassum*；珪藻：*Cyclotella sp.*, *Aulacoseira granulata*, *Asterionella formosa*, *Fragilaria crotonensis*；緑藻：*Volvox aureus* の出現が確認された。

室内培養実験

培地中での NH_2OH の化学的安定性について

培地中での NH_2OH の化学的安定性を検討するために、無菌培地に NH_2OH を添加し経時的にその減少量を測定した。まず、300 mL の三角フラスコに CA 250 mL を満たし、オートクレーブ（121°C, 20分）を用いて滅菌し、 NH_2OH が 20 及び 50 $\mu\text{gN L}^{-1}$ になるように添加した(Fig. 4-4)。その後、0~24時間の範囲で経時的に採水し、 NH_2OH の測定を行った。その結果、いずれの濃度の NH_2OH でも 24時間後には約2割減少することがわかった(Fig. 4-5)。また、いずれの濃度でも5日で NH_2OH が 0 $\mu\text{gN/L}$ まで減少することがわかった。



Fig. 4-4 NH₂OH の化学的安定性の操作方法

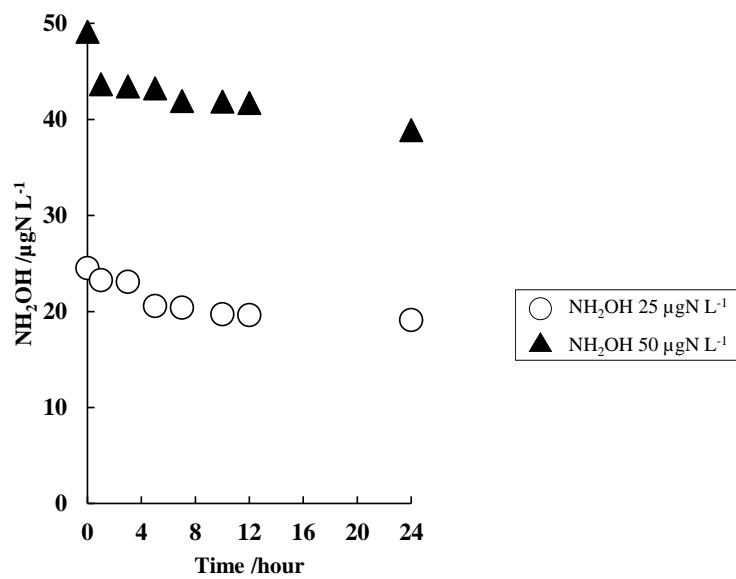


Fig. 4-5 NH₂OH の化学的安定性

淡水産 *Dolichospermum crassum* 無菌株を用いた培養実験

三瓶ダムで採取し、単離した淡水産 *Dolichospermum crassum* の無菌培養株を用いて NH_2OH の生成能について検討した。その結果、植物プランクトン量の指標となる Chl-*a* は徐々に増加した。それに伴い 15 日目から 22 日目で NH_2OH の増加が確認された (Fig.4-6)。

また、Fig. 4-7~9 の結果より Fig. 4-10 のような細菌は確認されず、*Dolichospermum crassum* 以外の細胞は検出されなかった。このことから、22 日間の培養期間中無菌状態が維持されており、 NH_2OH の増加は硝化反応及び Anammox 反応によるものではなく、ラン藻 *Dolichospermum crassum* によって生成されたものであることが明らかとなった。

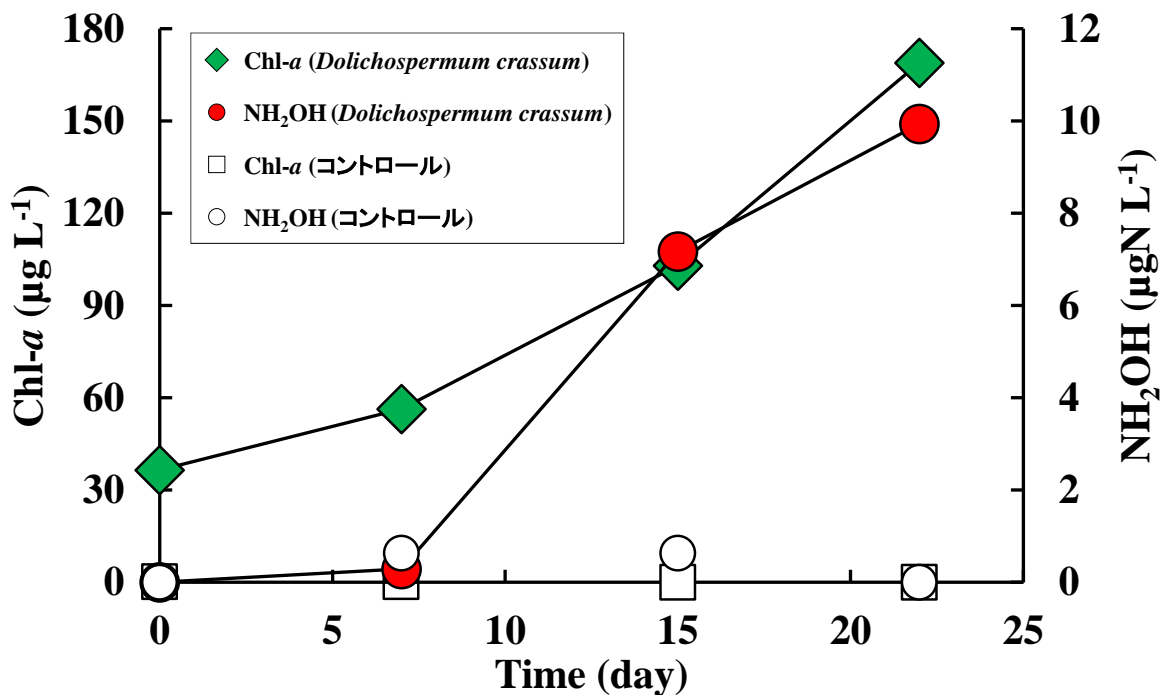


Fig. 4-6 培養実験における NH_2OH 及び Chl-*a* の時系列変化

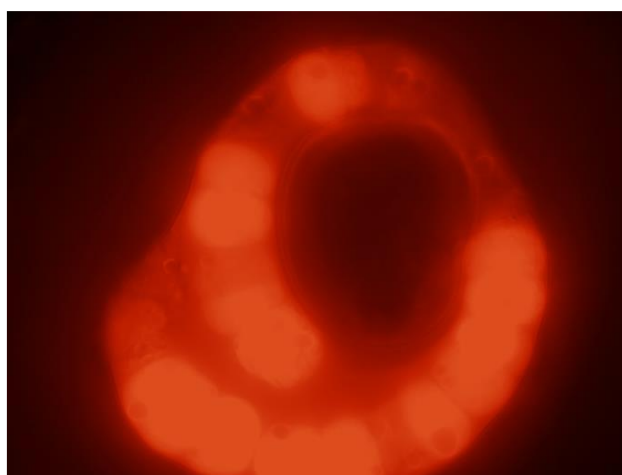


Fig. 4-7 無菌確認における *Dolichospermum crassum* の細胞 (培養 22 日目)

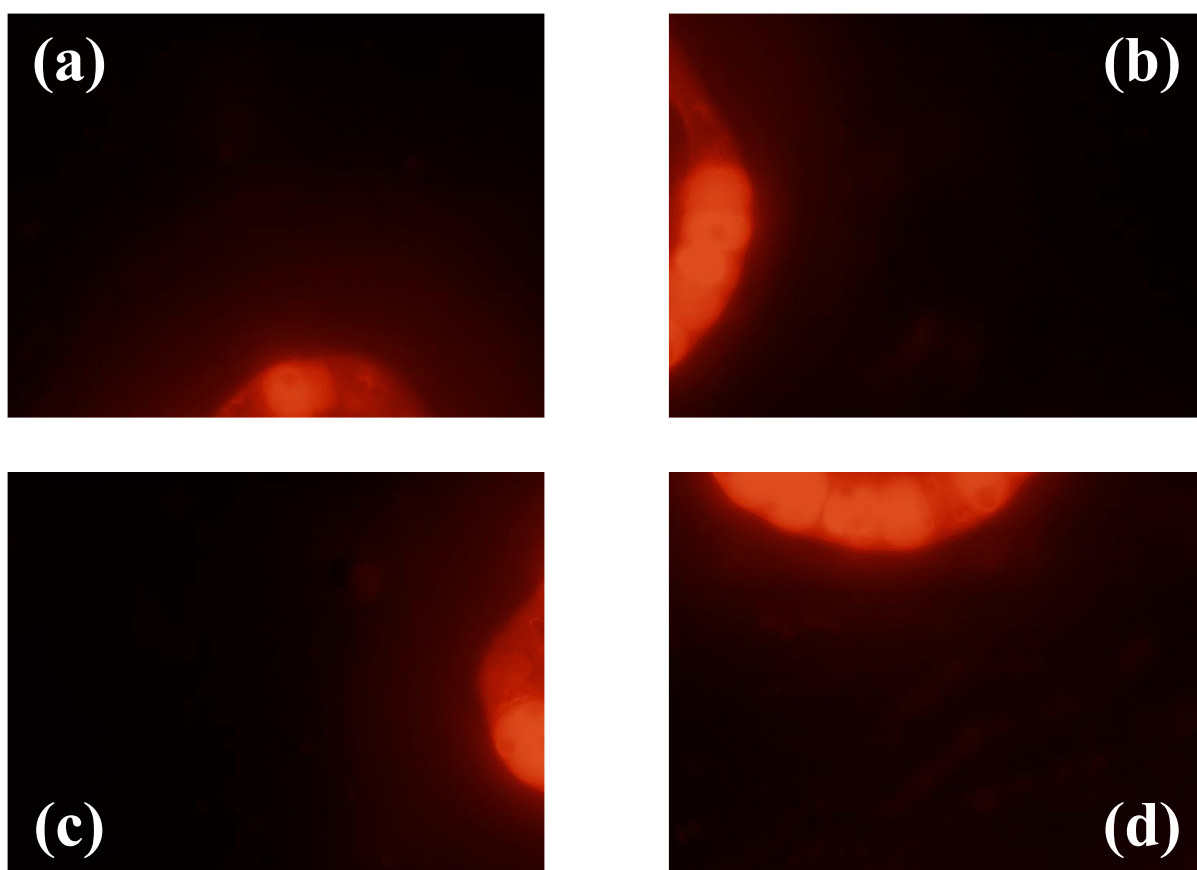


Fig. 4-8 *Dolichospermum crassum* の細胞周辺

(a: 上部分; b: 右部分; c: 左部分; d: 下部分)

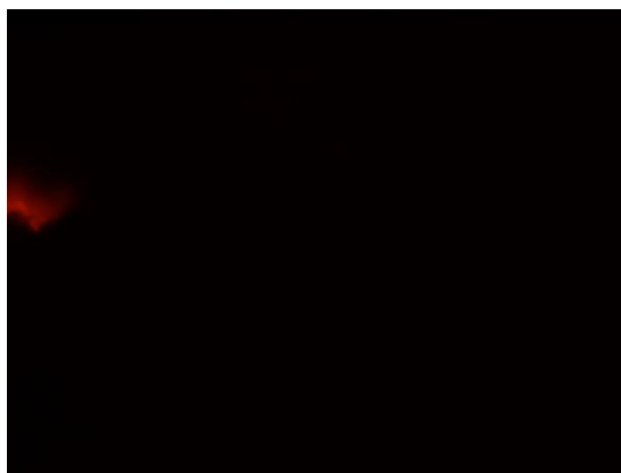


Fig. 4-9 無菌確認におけるコントロールの系（培養 22 日目）

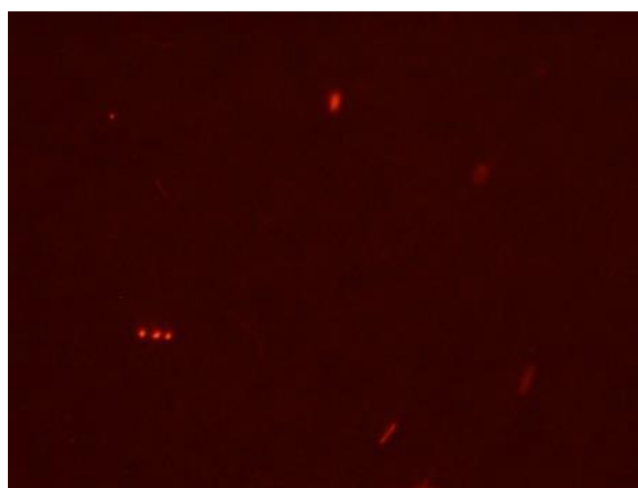


Fig. 4-10 細菌が混入した際の例

汽水産 *Coelosphaerium* sp.無菌株を用いた培養実験

他のラン藻においても NH_2OH の生成の有無を検討するため、宍道湖で採取された汽水産 *Coelosphaerium* sp.の単一無菌培養株を用いて培養実験を行い検討した。培養 0 日目と 22 日後の結果を Table 4-1 に示す。培養 22 日後の *Coelosphaerium* sp.の Chl-*a* 濃度は $268 \mu\text{g L}^{-1}$ であり、その時の NH_2OH 濃度は $9.1 \mu\text{gN L}^{-1}$ であった。これより、*Coelosphaerium* sp. の増殖に伴って NH_2OH 濃度の増加が確認された。 NH_2OH は、環境水の窒素サイクルにおいて、硝化反応の中間体 (Hofman and Lee, 1952; Tanaka, 1953) 及び Anammox 反応の中間体 (Oshiki et al., 2016; Kobayashi et al., 2019) として生成することが知られている。しかしながら、本培養は無菌であることから、硝化反応や Anammox 反応により生成された可能性は排除できる。よって、ラン藻 *Coelosphaerium* sp.が NH_2OH の生成に関与していることが明らかになった。

Table 4-1 *Coelosphaerium* sp.の培養結果

		Chl- <i>a</i>		NH_2OH	
		$\mu\text{g L}^{-1}$		$\mu\text{gN L}^{-1}$	
		0 day	22 day	0 day	22 day
<i>Coelosphaerium</i> sp.	<i>Lake Shinji</i> (brackish water)	40	268	<0.2	9.1

まとめ

三瓶ダムのフィールド調査により、植物プランクトンの生産層（有光層）において、高濃度の Chl-*a* が観測された同一層で、高濃度の NH₂OH の生成が確認され、布部ダムでの結果と同様に、表層で検出された NH₂OH がラン藻に由来することが示唆された。

また、NH₂OH が高濃度で検出された際の植物プランクトンの出現種を同定するとともに、NH₂OH が高濃度で検出された時期に三瓶ダムから単離した培養株 *Dolichospermum crassum*（ラン藻）の無菌化に成功した。この無菌培養株を用いた培養実験により、NH₂OH の生成・放出が明らかになった。また、比較のために行ったラン藻 *Coelosphaerium* sp. の無菌株を用いた培養実験においても、同様に NH₂OH の生成・放出が明らかになった。本結果は、ラン藻類が NH₂OH を生成するという世界初の事象を見出したものであり、今後、他のラン藻について NH₂OH の生成の有無を確認するとともに、さらに珪藻や緑藻についても検討したいと考えている。

第5章 総合考察

ダム湖表層における NH_2OH の生成について (第2章)

島根県の東部に位置する布部ダムにおいて、無機態窒素 (NH_4^+ や NO_2^- , NO_3^-) および亜酸化窒素 (N_2O : 温暖化ガス) に加えて、 NH_2OH についても鉛直的に観測した。その結果、表層水 (0m および 1m) 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 は一般に硝化反応及び 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、硝化反応や硝酸還元反応、Anammox 反応が起きる可能性は低い。そのため、表層においてこれらの反応により NH_2OH が生成される可能性は低いと考えられた。さらに、 NH_2OH が高濃度で検出される際には、植物プランクトンの指標である Chl-*a* も高濃度で検出され、 NH_2OH と Chl-*a* が同様の挙動を示すことを見出した。そこで、 NH_2OH と Chl-*a* 濃度との関係 ($n=110$) をみたところ、良好な正の相関性 ($R=0.70, p<0.01$) を示した。この結果より、表層で検出される NH_2OH は植物プランクトン由来の可能性が示唆された。

Fe^{3+} を用いた環境水中の NH_2OH の定量について (第3章)

酸化剤として Fe^{3+} を用いた NH_2OH の定量法の改良を行った。本法は、酸化剤として次亜塩素酸を使用した既存の定量法と同様に高感度で淡水、汽水及び海水サンプルに適用可能であった。さらに本法は、植物プランクトンの量に関わらず NH_2OH の定量値がほぼ 100%と一定であったのに対し、次亜塩素酸塩法 (従来法) では、植物プランクトン量が多いほど NH_2OH の定量値が低くなる (NH_2OH の定量値が過小評価を呈する) ことを見出した。これは、次亜塩素酸塩 (NaClO) は、その酸化力が強いため、植物プランクトン起源の有機物 (植物プランクトン自体を含む) の分解に使われ、結果として NH_2OH を N_2O に酸化するのに必要な NaClO 量が不足するためと考えられる。一方、 Fe^{3+}

には有機物を分解するまでの酸化力はないので、 NH_2OH の定量値に影響を受けなかったものと解釈できる。本法の開発により、植物プランクトンのような有機物が多い水域でも有機物の影響を受けず NH_2OH の定量が可能となった。

ラン藻による NH_2OH の生成・放出について（第4章）

布部ダムの結果をもとに、三瓶ダムにおいてもフィールド調査を行った。その結果、植物プランクトンの生産層（有光層）において高濃度の NH_2OH と $\text{Chl-}a$ が観測され、 NH_2OH の生成が植物プランクトン由来であることが示唆された。また、 NH_2OH が高濃度で検出された際の植物プランクトンの出現種を同定するとともに、 NH_2OH が高濃度で検出された際の植物プランクトンの出現種の単離培養株 *Dolichospermum crassum* の無菌化に成功した。これにより、植物プランクトンの NH_2OH 生成能の有無について、培養実験による検討が可能となった。この単離した無菌培養株を用いた培養実験により、経日変化の結果から NH_2OH の増加を確認することができ、ラン藻 *Dolichospermum crassum* による NH_2OH の生成・放出が明らかになった。さらに同様の培養実験によりラン藻 *Coelosphaerium* sp. による NH_2OH の生成・放出も明らかになった。これらの結果より、夏季におけるアオコ発生時の表水層で検出される 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唆され、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。

結語

NH₂OH の定量において、酸化剤に次亜塩素酸を用いる従来法は、酸化力が強いため、植物プランクトンを多く含むサンプルを対象とする場合、NH₂OH の定量値が過小評価されることが懸念された。そこで、酸化剤として Fe³⁺を用いる新たな定量法（本法）を開発した（第3章）。その結果、本法により植物プランクトンを多く含むサンプル（水域）を対象とする場合にも、NH₂OH の定量が可能となった。

また、布部ダムと三瓶ダムでのフィールド調査において、これまでの知見では表層で生成される可能性の低い NH₂OH が高濃度で検出され、表層で検出された NH₂OH は、植物プランクトンと関係のある可能性が示唆された。さらに、単離した無菌培養株を用いる培養実験によりラン藻 *Dolichospermum crassum* と *Coelosphaerium* sp. が NH₂OH を生成・放出することを明らかにした。これにより、ラン藻による未解明の窒素代謝プロセスの存在の可能性を提示した（第4章）。しかしながら、ラン藻が NH₂OH を生成する際の基質やラン藻以外の植物プランクトンの NH₂OH 生成能については、未解明であるため、今後さらなる検討が必要である。

第6章 摘要

植物プランクトンの異常増殖（アオコ）を引き起こす富栄養化したダム湖において、表層で高濃度のヒドロキシルアミン（ NH_2OH ）が蓄積する興味深い現象を発見した。 NH_2OH は一般に硝化反応及び Anammox 反応の中間体として生成されることが知られている。しかしながら表層では、硝化反応は光阻害を、Anammox 反応は酸素阻害を受けるため、これらの反応による可能性は低いと考えられる。そこで本研究では、ダム湖表層における NH_2OH の生成の由来を検討した。

ダム湖表層におけるヒドロキシルアミンの生成

布部ダムにおいて、夏季に表水層において高濃度の NH_2OH が蓄積する興味深い現象を発見した。 NH_2OH は一般に硝化反応、硝酸還元反応、及び 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は、硝化反応は光阻害を、Anammox 反応は酸素の影響を受けるため、これらの反応が起きる可能性は低い。また、 NH_2OH が高濃度で検出された際、植物プランクトンの指標となる Chl-*a* も高濃度で検出され、さらに NH_2OH と Chl-*a* には良好な正の相関（ $R=0.70$ ）があることが分かった。以上の結果より、夏季において表水層で検出される NH_2OH は、植物プランクトンと関係のある可能性が示唆された。

Fe³⁺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

宍道湖や中海のような環境水中の微量ヒドロキシルアミン (NH₂OH) の定量には、酸化剤として次亜塩素酸を用いた Seike et al. (2004) や Kato et al. (2017) の方法が使用される。しかしながら、これらの方法は、植物プランクトン (有機物) により影響を受けることが分かった。そのため、アオコや赤潮などの植物プランクトンが異常増殖した水域や植物プランクトンの培養実験に従来法を適用することは難しいと判断された。

そこで、Breymann et al. (1982) や Butler et al. (1986) らの Fe³⁺を用いたヒドロキシルアミン (NH₂OH) の定量法を改良した。彼らの方法は、回収率が低くばらつきがあるため実サンプルへの適用は難しい。そこで本研究では、Fe³⁺添加時の最適 pH を検討し、緩衝液としてクロロ酢酸-水酸化カリウム緩衝液を添加することで 100%の回収率を得られることを見出した。

本法の標準定量操作は次の通りである。試料を 70 mL の褐色ガラスバイアル瓶に入れ、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。そこに、クロロ酢酸緩衝液 1.0 mL と 105 mmol L⁻¹ 塩化鉄(III)溶液 1.0 mL を順次添加した後、実験室に持ち帰り、窒素ガス (>99.99995%)で気相を作成した。この気相中の N₂O を、ECD-GC で定量し、液相中の N₂O は Weiss and Price (1980)の式を用いて算出した。本法は、淡水、汽水及び海水サンプルに適用可能であり、加えてアオコや赤潮などの植物プランクトンのような有機物が多い水域でも有機物の影響を受けない定量法である。

ラン藻によるヒドロキシルアミンの生成・放出

フィールド調査の結果より、布部ダムの結果と同様に、三瓶ダムの表層において高濃度の NH_2OH と $\text{Chl-}a$ が同時に観測された。また、 NH_2OH が高濃度で検出された際の植物プランクトンの出現種を同定するとともに、植物プランクトンの出現種の単離培養株 *Dolichospermum crassum* の無菌化に成功したことで、ラン藻の NH_2OH 生成能の有無について、培養実験による検討が可能となった。この単離した無菌培養株を用いた培養実験の経日変化から NH_2OH の明白な増加を確認することができ、ラン藻 *Dolichospermum crassum* による NH_2OH の生成・放出が明らかになった。この結果より、夏季におけるアオコ発生時の表水層で検出される NH_2OH は、ラン藻により生成・放出されたものであることが強く示唆され、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がクローズアップされた。

Summery

I discovered an interesting phenomenon in which high concentrations of hydroxylamine accumulate in a eutrophic dam lake that occasionally causes phytoplankton overgrowth (blue-green algae). NH_2OH is generally known to be produced as an intermediate in nitrification, nitrate reduction, and anammox reactions. However, in epilimnion, the nitrification reaction is photoinhibited, and the nitrate reduction reaction and the anammox reaction are oxygen-inhibited, so it is considered unlikely that these reactions are caused. Therefore, in this study, the origin of hydroxylamine generation in epilimnion of the dam lake was investigated.

Generation of hydroxylamine in epilimnion of dam lake

I discovered an interesting phenomenon in which high concentrations of hydroxylamine accumulate in epilimnion of Fube Dam in summer. NH_2OH is generally known to be produced as an intermediate in nitrification, nitrate reduction, and anammox reactions. However, since these reactions are affected by light and oxygen in epilimnion, it is unlikely that nitrification, nitrate reduction, and anammox reactions will occur. In addition, when NH_2OH was detected at a high concentration, Chl-*a*, which is an index of phytoplankton, was also detected at a high concentration. Furthermore, it was found that there was a good positive correlation ($R = 0.70$) between NH_2OH and Chl-*a*. From the above results, it was suggested that NH_2OH detected in the epilimnion of dam lake in summer may be related to phytoplankton.

Sensitive gas chromatography detection of nanomolar hydroxylamine in environmental water
by Fe(III) oxidation

The methods of Seike et al. (2004) and Kato et al. (2017) using hypochlorite as an oxidizing agent are used to quantify nanomolar hydroxylamine (NH₂OH) in environmental waters such as Lake Shinji and Lake Nakaumi. However, we have found that these methods are affected by phytoplankton (organic matter). Therefore, it is difficult to apply these methods to water in which phytoplankton such as water bloom and red tides have overgrown and phytoplankton culture experiments. Therefore, the method for quantifying hydroxylamine using Fe³⁺ reported by Breymann et al. (1982) and Butler et al. (1986) was improved. Their method is difficult to apply to actual samples due to low recovery and variability. Therefore, in this study, we investigated the optimum pH when Fe³⁺ was added, and found that a recovery of 100% could be obtained by adding a chloroacetic acid buffer as a buffer.

The sample was placed in a 70 mL brown glass vial and sealed with butyl rubber and an aluminum seal to prevent air from entering the vial. After adding 1.0 mL of chloroacetic acid buffer and 1.0 mL of 105 mmol L⁻¹ ferric chloride solution in sequence, this was taken back to the laboratory and a headspace was prepared with nitrogen gas (> 99.99995%). This method is applicable to freshwater, brackish water and seawater samples, and is not affected by organic matter even in waters rich in organic matter such as phytoplankton such as water bloom and red tide.

Generation of hydroxylamine by blue-green algae

From the results of the field survey, high concentrations of NH_2OH and *Chl-a* were observed simultaneously on the surface of the dam lake. In addition, we identified the species of phytoplankton that appeared when NH_2OH was detected at high concentrations, and also succeeded in sterilizing the isolated culture strain *Dolichospermum crassum*. This enabled to examine the presence or absence of NH_2OH -producing ability of phytoplankton in culture experiments. A clear increase in NH_2OH levels could be confirmed by diurnal changes in the culture experiment using this isolated sterile culture strain, and the production and release of NH_2OH by the cyanobacteria *Dolichospermum crassum* was clarified. This result suggests that NH_2OH detected in the surface water layer in summer is produced and released by blue-green algae, and the existence of an unexplained nitrogen metabolism process by phytoplankton is highlighted

参考文献

- Afkhami A., Madrakian T., and Maleki A. (2006) Indirect kinetic spectrophotometric determination of hydroxylamine based on its reaction with iodate. *Analytical Sciences*, 22, 329-331.
- Anderson J. H. (1964) The copper-catalysed oxidation of hydroxylamine. *Analyst*, 89, 357-362.
- Astrid. A. van de Greef, 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 ¹⁵N studies in a fluidized bed reactor. *Microbiology*, 143, 2415-2421.
- Bendschneider K. and Robinson R. J. (1952) A new spectrophotometric method for the determination of nitrite in sea water. *Journal of Marine Research*, 11, 87-96.
- Billen G., Somville M., DeBecker E., and Servais P. (1985) A nitrogen budget of the Scheldt hydrographical basin. *Netherlands Journal of Sea Research*, 19, 223-230.
- Burrell P. C., Keller J. and Blackall L. L. (1998) Microbiology of a nitrite-oxidizing bioreactor. *Applied and Environmental Microbiology*, 64, 1878-1883.
- Butler J. H., and Gordon L. I. (1986) An improved gas chromatographic method for the measurement of hydroxylamine in marine and freshwaters. *Marine Chemistry*, 19, 229-243.

Csaky T. Z. (1948) Estimation of bound hydroxylamine in biological materials. *Acta Chemica Scandinavica*, 21, 450-454.

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., Wagner M. (2015) Complete nitrification by nitrospirilla bacteria. *Nature*, 528, 504–509.

Day Jr. R. A. and Underwood A. L. (1980) *Quantitative analysis*—4th edition, Prentice-Hall, Inc., Englewood Cliffs, New Jersey, U.S.A.

Endres G., and Kaufmann L. (1937) Determination of minute amounts of hydroxylamine, nitrite and nitrate. *Justus Liebigs Annalen der Chemie*, 530, 184-194.

Fazzolari E., Mariotti A., and Germon J.C. (1990) Nitrate reduction to ammonia: a dissimilatory process in *Enterobacter amnigenus*. *Canadian Journal of Microbiology*, 36, 779-785.

Fiadeiro M., Solorzano L., and Strickland J. D. H. (1967) Hydroxylamine in seawater. *Limnology and Oceanography*, 12, 555-556.

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.

藤森 英治 (2013) これからの環境分析化学入門. 講談社サイエンティフィック, 40-67.

Glover H. (1977) Effect of iron deficiency on *Isochrysis galbana* (Chrysophyceae) and *Phaeodactylum tricornerutum* (Bacillariophyceae). *Journal of Phycology*, 13, 208-212.

Godo T., Saki Y., Nojiri Y., Tsujitani M., Sugahara S., Hayashi S., Kamiya H., Ohtani S., and Seike Y. (2017) Geosmin-producing Species of *Coelosphaerium* (Synechococcales, Cyanobacteria) in Lake Shinji, Japan. *Scientific Reports*, 7, 41928

Greene R. M., Geider R. J., and Falkowski P. G. (1991) Effect of iron limitation on photosynthesis in a marine diatom. *Limnology and Oceanography*, 36, 1772-1782.

Hayashi S., Ohtani S., Godo T., Nojiri Y., Saki Y., Esumi T., and Kamiya H. (2019) Identification of geosmin biosynthetic gene in geosmin-producing colonial cyanobacteria *Coelosphaerium* sp. and isolation of geosmin non-producing *Coelosphaerium* sp. from brackish Lake Shinji in Japan. *Harmful Algae*, 84, 19-26.

Hofman T. and Lees H. (1952) The biochemistry of the nitrifying organisms. IV. The respiration and intermediary metabolism of *Nitrosomonas*. *Biochemical Journal*, 54, 579-583

Ichimura T., and Watanabe M. (1974) The *Closterium calosporum* complex from the Ryukyu Islands. Variation and taxonomical problems. *Memoirs of the National Science Museum*, 7, 89-102.

- Kartal B., and Keltjens J. T. (2016) Anammox biochemistry: a tale of heme c proteins. *Trends in Biochemical Sciences*, 41, 998-1011.
- 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 Science*, 33, 691-695.
- Kobayashi K., Makabe A., Yano M., Oshiki M., Kindaichi T., Casciotti K. L., and Okabe S. (2019) Dual nitrogen and oxygen isotope fractionation during anaerobic ammonium oxidation by anammox bacteria. *ISME Journal*, 13, 2426-2436.
- Korte W. D. (1992) Determination of hydroxylamine in aqueous solutions of pyridinium aldoximes by high-performance liquid chromatography with UV and fluorometric detection. *Journal of Chromatography A*, 603, 145-150.
- Kuypers M. M. M., Sliemers A. O., Lavic G., Schmid M., Jørgensen B. B., Kuenen J. G., Damste J. S. S., Strous M., 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 Ecology* 14, 275-304.

Lomas M. W., and Lipschultz F. (2006) Forming the primary nitrite maximum: nitrifiers or phytoplankton? *Limnology and Oceanography*, 51, 2453-2467.

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.

Mitamura O., and Saijo Y. (1980) Urea supply from decomposition and excretion of zooplankton. *Journal of the Oceanographical Society of Japan*, 36, 121-125.

野尻 由香里・山根 馨太・加藤 季晋・大谷 修司 (2019): 宍道湖・中海の植物プランクトン水質調査結果(2019年度). 島根県保健環境科学研究所報, 61, 85-94

Novak R. and Wilson P. W. (1948) The utilization of nitrogen in hydroxylamine and oximes by *Azotobacter vinelandii*. *Journal of Bacteriology*, 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*”. *Environmental Microbiology*, 18, 3133-3143.

- Parsons T., and Strickland J. (1963): Discussion of spectrophotometric determination of Marine-plant Pigments, with Revised Equations for Ascertaining Chlorophylls and Carotenoids. Journal of Marine Research, 21, 164-171
- Pittwell L. R. (1975) The determination of hydroxylamine in Ethiopian rivers and lakes., "Mikrochimica Acta [Wien] 1975II, Springer-Verlag Press
- Pringsheim E. G. (1946) Pure culture of algae, their preparation and maintenance. Cambridge Univ. Press, 119
- Rao K. B. and Rao G. G. (1957) Determination of hydroxylamine - Use of copper sulphate as catalyst Z. Analytical Chemistry, 157, 100-104.
- Ravishankara A. R., John S. D., Robert W. P. (2009) Nitrous Oxide (N₂O) : The dominant ozone-depletion substance emitted in the 21st century. Science, 326: 123-125.
- Riley J. P. and Skirrows G. (1965) Chemical Oceanography, Academic Press, New York., 648
- Sagi T. (1966) Determination of ammonia in sea water by the indophenol method and its application to the coastal and off-shore waters. Oceanographical Magazine, 18, 43-51.
- Saijo Y., Mitamura O., and Takahashi M. (1982) Nitrogen metabolism in freshwater lake. Proc. 3rd Japan-Brazil Symp. Science and Technology, Tokyo, 253-256.

SCOR-UNESCO (1966) Determination of photosynthetic pigments in seawater. Report of SCOR-UNESCO Working Group 17, Monographs on oceanographic methodology, 1, UNESCO, Paris

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

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

Seitzinger S. P. (1988) Denitrification in freshwater and coastal marine ecosystems: Ecological and geochemical significance. Limnology and Oceanography, 33, 702-724.

Senga Y., Mochida K., Fukumori R., Okamoto N., and Seike Y. (2006) N₂O accumulation in estuarine and coastal sediment: The influence of H₂S on dissimilatory nitrate reduction. Estuarine Coastal Shelf Science, 67, 231-238

Senga Y., Mochida K., Okamoto N., Fukumori R., and Seike Y. (2002) Nitrous oxide in Lake Nakaumi, Japan, II: The role of nitrification and denitrification for N₂O accumulation. Limnology, 3, 21-27.

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

Smith M.S., and Zimmerman K. (1981) Nitrous oxide production by non-denitrifying soil nitrate reducers. *Soil Science Society of America Journal*, 45, 865-871.

Someya T. (1995) Three-dimensional observation of soil bacteria in organic debris with a confocal laser scanning microscope. *Soil Microorganisms*, 46, 61-69.

染谷孝, 王曉丹, 龔春明, 中川秀明, 田中智佳子, 石橋正文, 横堀加奈里, 井上興一 (2003) 蛍光染色による土壌・堆肥中の特異的微生物検出技術. *土と微生物*, 57, 115-123.

Straus M, Fuerst JA, Kramer EHM, Logemann SM, Muyzer G, van de Pas-Schoonen KT, Webb R, Kuenen JG, Jetten M (1999) Missing lithotroph identified as a new planctomycete, *Nature* 400, 446-449.

Takahashi M. and Saijo Y. (1982) Nitrogen metabolism in Lake Kizaki, Japan. II. Distribution and decomposition of organic nitrogen. *Archiv fur Hydrobiologie*, 92, 359-376.

武田重信 (2016) 海洋亜表層の窒素循環を制御する微量金属元素の複合メカニズム, 科研費 (挑戦的萌芽研究) 研究成果報告書

Takahashi M. and Saijo Y. (1983) Nitrogen metabolism in Lake Kizaki, Japan. IV. Ammonium maximum layer in the metalimnion. *Archiv fur Hydrobiologie*, 97, 18-195.

Tanaka M. (1953) Occurrence of hydroxylamine in lake waters as an intermediate in bacterial reduction of nitrate. *Nature*, 171, 1160-1161.

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

von Breyman M. T., de Angells M. A., and Gordon (1982) Gas chromatography with electron capture detection for determination of hydroxylamine in seawater. *Analytical Chemistry*, 54, 1209-1210.

Weiss R. F. and Price B. A. (1980) Nitrous oxide solubility in water and seawater. *Marine Chemistry*, 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. *Journal of the Marine Biological Association of the U.K.*, 47, 23-31.

Yoshioka T. and Saijo Y. (1985) : Active nitrification in the hypolimnion of Lake Kizaki in early summer. II. Effects of light on nitrification in water. *Archiv fur Hydrobiologie*, 105, 1-9.

論文目録

学術論文

- (a) 論文題目 : Sensitive gas chromatography detection of nanomolar hydroxylamine in environmental water by Fe(III) oxidation

共著者名 : Aiko HIKINO, Shogo SUGAHARA, Toshikuni KATO, Yukiko SENGA, Michiko EGAWA, Ja Yeong PARK, Hiroshi KAMIYA, Hidekazu TANAKA, Yasushi SEIKE

掲載雑誌 (巻, 号, 頁) :

Analytical Sciences (37 巻, 2 号, 347-351 頁)

ISSN : 0910-6340

発行年月 : 2021 年 2 月 10 日

- (b) 論文題目 : ダム湖表水層におけるヒドロキシルアミンの生成起源

共著者名 : 引野 愛子, 加藤 季晋, 管原 庄吾, 林 昌平, 大谷 修司, 千賀 有希子, 神門 利之, 江川 美千子, 朴 紫暎, 田中 秀和, 清家 泰

掲載雑誌 (巻, 号, 頁) :

陸水学雑誌 (掲載決定)

ISSN : 0021-5104

発行年月 : 受理

謝辞

本研究を遂行するにあたり、終始熱心なご指導、ご鞭撻いただいた島根大学エスチュアリー研究センター特任教授 清家泰先生、島根大学教授 田中秀和先生、講師 管原庄吾先生、助教 朴柴暎先生、助手 江川美千子先生に厚く御礼を申し上げます。

本研究の遂行に際して、ご協力とご助言を頂いた島根大学教授 大谷修司先生、助教 林昌平先生、島根県保健環境科学研究所研究員 加藤季晋博士、島根県環境保健公社 佐藤紘子氏、東邦大学准教授 千賀有希子先生、島根県保健環境科学研究所環境科学部長 神門利之博士、島根県保健環境科学研究所 神谷宏博士、島根県保健環境科学研究所水環境科主任研究員 野尻由香里氏に感謝と御礼を申し上げます。

また、実験の実施に際して惜しみなく研究に協力していただいた松江土建株式会社の皆様、島根県保健環境科学研究所水環境科の皆様に感謝と御礼を申し上げます。

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両親を始め、研究室の先輩方や同期、心優しい親友達など多くのご協力いただいた皆様に深い感謝の意を表して謝辞といたします。