

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 21 日現在

機関番号：15201

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K12584

研究課題名(和文) 窒素浄化に対するアナモックス反応の寄与に関する研究

研究課題名(英文) Research on contribution of ANAMMOX reaction for nitrogen removal

研究代表者

清家 泰 (Seike, Yasushi)

島根大学・エスチュアリー研究センター・特任教授

研究者番号：30243421

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)： アナモックス反応(新たな窒素浄化プロセス)の中間体である ヒドラジンと ヒドロキシルアミンの環境水に適用可能な定量法を新規に開発した。： 固相抽出による濃縮定量法で、ヒドラジンとパラ-ジメチルベンズアルデヒドを反応させて生成するアルダジンを定量する方法(定量下限0.2 µgN/L)を確立した。： 次亜塩素酸塩と反応させて生成する亜酸化窒素をECD-GCで測定する方法で、海水に含まれる集化物イオンがその定量を妨害したが、フェノール溶液の添加により妨害を排除できることを見出し確立に成功した。いずれの定量法も定量下限は0.2 µgN/Lであり、淡水から海水まで広い塩分範囲で適用可能であった。

研究成果の概要(英文)： We newly developed a simple in situ method for the determination of trace hydrazine and hydroxylamine, intermediate products in the ANAMMOX reaction, applicable to environmental water. The determination of the trace hydrazine is based on the concentration of aldazine compound formed by the reaction of hydrazine with p-dimethylaminobenzaldehyde. We next developed a method for quantifying trace hydroxylamine in brackish-and sea-water samples. We used a method of ECD-GC measurement of the nitrous oxide produced by the reaction with sodium hypochlorite. Those new methods can quantify for natural water samples with a wide range of salinity, and then were applied successfully to the samples from Lake Nakaumi, a brackish lake located in the eastern part of Shimane Prefecture, Japan. The lower limit of detection for those new methods were 0.2 µgN/L.

研究分野：環境化学，環境分析化学，生物地球化学

キーワード：アナモックス反応 中間体 ヒドロキシルアミン ヒドラジン 窒素浄化プロセス 汽水湖 エスチュアリー 定量法の開発

1. 研究開始当初の背景

近年、新たな窒素除去プロセスであるアナモックス(嫌氣的アンモニア酸化)反応が発見された。その反応プロセスはヒドロキシルアミン(NH₂OH)とNH₄⁺が反応し中間体としてヒドラジン(N₂H₄)を形成後、最終的に分子状窒素(N₂)となり系外に放出される(Astrid A. van de Graaf et al. 1997)というものである。

報告者は、これまで科研費による研究助成を受け(課題番号:09878100, 14380243 & 19201016)、硝化の副産物や脱窒の中間体として生成されるN₂O(温暖化ガス)に着目し検討してきたが、それらの研究を進めるなかでNH₂OHの新規な定量法を開発した。さらに、微量のN₂H₄の定量法の開発にも成功した。

これにより、定性的にはあるが、現場のNH₂OHとN₂H₄を測定することでアナモックス反応が起こっているか否かの判別(定性分析)が可能となった。さらに、間接的な定量法ではあるが、アセチレン阻害法を組み合わせることにより、蓄積したN₂O量から一般的な脱窒量を求め、全窒素の減少量からアナモックスによる窒素除去量(脱窒量)を見積もること(定量分析)を可能にした。本研究はアナモックスによる脱窒量を見積もるための簡便な手法を提案するものである。

2. 研究の目的

窒素はリンとともに環境水の富栄養化の原因元素であり、自然の有する窒素除去機能に関する研究は重要である。これまで一般的な硝化・脱窒に関しては、国内外で盛んに研究され、有用な情報・知見も多い。しかしながら、アナモックス反応に関する研究は、世界的にも案外少ない。それは、アナモックス反応が起こっているかどうかを簡単に判別する方法(定性分析法)がなかったことも要因と考えられる。

報告者らは、アナモックス反応の基質であるNH₂OHとその反応の中間体であるN₂H₄の新規な定量法を開発した。本研究では、それら新規な定量法を完成・論文化するとともに、それらを活用し、自然界の新たな窒素除去プロセスであるアナモックス反応の有無の判別法[(A)定性分析法]、およびアナモックス細菌による脱窒量の簡便な測定法[(B)定量分析法]を提案する。本研究は、現場調査および室内実験を通じて本手法の有効性を検証し、今後の研究の発展に資することを目的とした。また、将来、現地の酸化還元状態を知る上での新たな指標として、鉄の存在状態「Fe(II)、Fe(III)」を利用できる可能性がある。そこで、(C)Fe(III)の直接定量法の開発についても検討した。

3. 研究の方法

報告者らの提案する手法にしたがって、(A)アナモックス反応が起こっているかど

うかの判別(定性分析)および(B)一般的な脱窒細菌による脱窒量(従来型)とアナモックス細菌による脱窒量の見積もり(定量分析)について現場観測および室内実験により検討した。

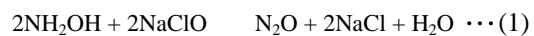
4. 研究成果

(A) アナモックス反応が起こっているかどうかの判別法(定性分析法)の開発

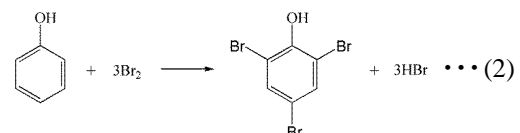
(a) 環境水中微量ヒドロキシルアミンの次亜塩素酸塩による酸化-高感度 ECD-GC 定量法(学術誌に掲載済) 詳細は掲載論文(Kato et al. 2017a)をご覧ください。

(1) 汽水・海水中の定量妨害物質

本法の基本原理は、次反応(1)式に基づく(Seike et al. 2004)。



我々は、NH₂OHが次亜塩素酸塩(NaClO)との反応により亜酸化窒素(N₂O)を生成することを発見したが(Seike et al. 2004)、この反応は、淡水試料には定量的に進行するものの、汽水・海水試料に対しては、塩分のみならずNH₄⁺の妨害も受けた。そこで本研究により、海水成分の何が原因なのかを検討したところ、臭化物イオン(Br⁻)であることが分かり、そのBr⁻とNaClOが反応し生成するBr₂がNH₂OHやNH₃と反応するため、その妨害が複雑化することを突き止めた。そこで、次式(2)の反応を利用することで、臭素(Br₂)の妨害を排除できるのではないかと考え検討したところ、功を奏し問題を解決できた。



(2) ヒドロキシルアミンの標準定量操作

前述の検討により、本法の定量操作を以下のように確立するに至った(Fig.1)。試料水を70 mLのガラス瓶に気泡が入らないように入れ、ブチルゴム栓とアルミシールで密封した。次にBr₂の妨害をなくすために63.6 mMフェノール溶液1.0 mLを、さらにNH₂OHをN₂Oに酸化するために3.5 mM次亜塩素酸ナトリウム溶液1.5 mLを添加した。ここまでの操作を現地で行う。次にサンプルを実験室に持ち帰り、ヘッドスペース(気相)をつくるためにマグナムシリンジを用いて窒素ガス(純度99.9%)を40 mL注入した。数分間攪拌し気液平衡とした後、気相0.2 μLをガスクロ(ECD-GC)に注入し気相のN₂O濃度を測定した。

液相のN₂O濃度は、WeissとPriceの式(Weiss and Price 1980)から算出した。本法の定量下限は0.2 μgN/Lであり高感度定量が可能である。元々試料水中に溶存しているN₂Oの定量用サンプルには、現地でホルマリ

ン（最終濃度 1%）を添加し実験室に持ち帰り測定した。NH₂OH 濃度はその N₂O 濃度を差し引くことによって求められる。

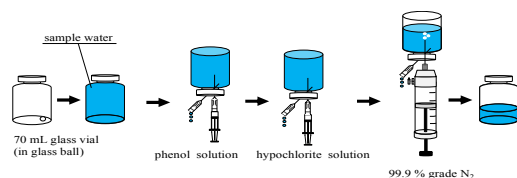


Fig.1 Standard quantitative procedure of hydroxylamine

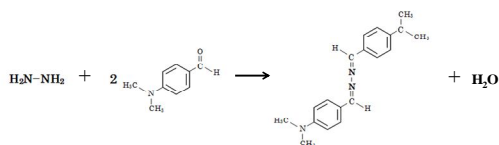
(3) 本法の回収率と再現性および環境水への適用

本法の回収率と再現性を確認するために、塩分の異なる汽水試料（2.2, 11.5 及び 26.0 psu）に NH₂OH（20 及び 50 µgN/L）をそれぞれ添加し、その回収率と相対標準偏差（RSD）を調べたところ、バラツキが小さく（RSD: 1.6 ~ 3.8%）、高い回収率を示す結果が得られ、本法が汽水試料に適用可能であることが示された。

本法を汽水湖中海に適用し NH₂OH 及び N₂O の鉛直分布を観測した。NH₂OH は深度 5m から増加しはじめ、深度 6m で最大（1.6µgN/L）となり、N₂O は深度 4m から増加しはじめ、深度 6.5m で最大（1.6µgN/L）を示した。これより本法の有用性が確認された。

(b) 環境水中微量ヒドラジンの固相抽出による定量（学術誌に掲載済） 詳細は掲載論文（Kato et al. 2017b）をご覧ください。

本研究では、固相抽出による濃縮定量法について検討した。本法の基本原理は、N₂H₄ とパラ-ジメチルアミノベンズアルデヒド（*p*-DMAB）の反応（次式）によって生成するアルダジンを Sep-Pak C18 カートリッジに吸着・溶離した後、溶離液のアルダジン濃度を吸光度定量するものである。



(1) 定量条件の検討

SeP-Pak C18 は N₂H₄ から生成するアルダジンを定量的に吸着し、その吸着容量は少なくとも N₂H₄ の 2.0 µgN に相当することが分かった。SeP-Pak C18 に吸着された状態で少なくとも 12 時間は安定であった。そのアルダジンは、溶離剤としてエタノールと 12M HCl

の比を 10 : 1 (v/v) にしたとき完全に溶離された。

妨害物質として知られる尿素及び硫化水素については、幸いなことに、固相抽出法を用いる本法では、問題にならなかった。また、海水成分による影響も観られなかった。その他、浄化槽のような有機物を多量に含むサンプルについては、予め SeP-Pak C18 カートリッジに通水することで有機物を吸着・除去できることが分かった。

(2) ヒドラジンの標準定量操作

前述の定量条件の検討を踏まえ、本法の定量操作を以下のように確立するに至った（Fig.2）。SeP-Pak C18 カートリッジは、使用前に、50%エタノール 10 mL を流速 10 mL/min で通水し洗浄した。有機物除去のため、試料水がフィルターホルダーと SeP-Pak C18 カートリッジを経由して可変式のプラスチックシリンジ（50 mL）の中に入れられた。そのシリンジの中に *p*-DMAB 溶液 6 mL を注入して N₂H₄ と反応させアルダジンを形成した。10 分後、新しい SeP-Pak C18 カートリッジに通水しアルダジンを吸着した。ここまでの操作を現地で行い、その後、実験室に持ち帰り 12 時間以内に溶離剤（エタノール : 12M HCl = 10:1）8 mL を通水してアルダジンを溶離し、457 nm で吸光度を測定した。

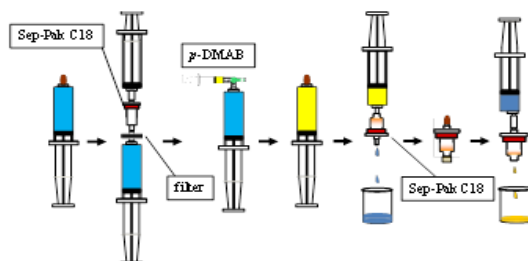


Fig.2 Standard quantitative procedure of hydrazine

(3) 本法の回収率と再現性および環境水への適用

淡水、汽水、及び浄化槽のサンプルを用い検討した。ヒドラジンの回収率は 92 ~ 98% の範囲にあり、バラツキも小さく（RSD: 2.0 ~ 3.0%）、良好な結果を示した。本法を汽水湖中海に適用しヒドラジン N₂H₄ の鉛直分布を観測した。N₂H₄ 濃度は 5 m 以深で高く、特に NO₂⁻ 濃度の蓄積が観られる層で高くなる傾向を示した。これより本法の有用性が確認された。

<引用文献>

Astrid, A. van de Graaf, P. de Bruijn, L. A. Robertson, M. S. M. Jetten, and J. G. Kuenen (1997): Microbiology, 143, 2415.

Seike Y, Fukumori R, Senga Y, Oka H, Fujinaga K, and Okumura M (2004): Analytical Sciences, 20, 139.

(B) 一般的な脱窒細菌による脱窒量とアナモックス細菌による脱窒量の見積もり法 (定量分析法) の開発 (投稿準備中)

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り、アナモックス反応を加えた窒素循環モデルに再構築する必要がある。しかしながら、水圏におけるアナモックス反応の研究は案外少ない。その理由として、環境水中のアナモックス活性の測定に用いられる ^{15}N 窒素同位体の測定には高価で煩雑な機器を必要とし、かつ洗練された実験環境と技術を要することが挙げられる。

我々は、前述したように、アナモックス反応の中間体である N_2H_4 (Kato et al., 2017a) と NH_2OH の定量法 (Kato et al., 2017b) の開発に成功した。そこで本研究では、これらの定量法とアセチレン阻害法 (Yoshinari et al. 1977) を併用した培養を行うことで、 ^{15}N トレーサー法に代わる新しいアナモックス活性の測定法を開発した。アセチレン阻害法では、生成した N_2O を測定することで従来型の脱窒反応による窒素除去量を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は N_2O を含めた DIN の減少量から推算できる。本報は、 ^{15}N を用いない、新規なアナモックス活性の測定法を提唱するものである。

(1) 中海湖心の無機態窒素の鉛直分布

Fig.3 に中海湖心における無機態窒素の鉛直分布を示す。 NO_2^- は深度 4 m から蓄積し、5 m 以深で $200 \mu\text{gN L}^{-1}$ 程度蓄積していた。 NH_2OH と N_2H_4 も NO_2^- と同様に 4 m 以深で増加していたことから、本水域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た。

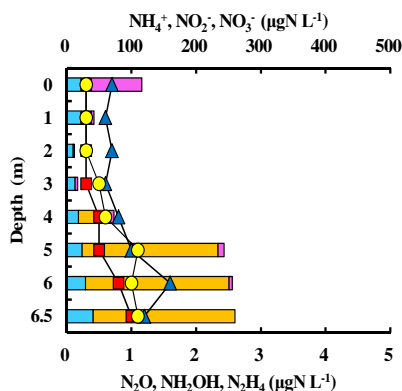


Fig. 3 Vertical distribution of dissolved inorganic nitrogen in Lake Nakaumi. ●, N_2H_4 ; ▲, NH_2OH ; ■, N_2O ; □, NH_4^+ ; ▨, NO_2^- ; ▩, NO_3^- .

中海湖心への海水による酸素供給は 5 m 以深で観られることから、海水の流入と流出による好気的環境と嫌気的環境の繰り返しが、中海湖心における 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た。

(2) 培養実験

中海湖心の底層水を用い、アセチレン阻害法を併用した培養実験を行い検討した。培養開始 3 日目にアナモックス反応の中間体である NH_2OH と N_2H_4 が増加したことから、アナモックス反応の活性化を確認した。また、3 日目には N_2O も増加した。この N_2O の増加量が従来型の脱窒による窒素除去量に該当する。また、 N_2O 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見積もると、今回の培養実験では、約 6 割がアナモックス反応によって除去されたものと推察された。

結論

本研究では、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。中海湖心の底層において、 NO_2^- 蓄積時にアナモックス反応の中間体である NH_2OH 及び N_2H_4 が増加することを見出し、アナモックス反応が生じていることを明らかにした。無機態窒素の鉛直分布では、 NO_2^- は深度 4 m から蓄積し、5 m 以深で $200 \mu\text{gN L}^{-1}$ 程度蓄積していた。アナモックス反応の中間体である NH_2OH と N_2H_4 も NO_2^- と同様に、4 m 以深で増加していたことから、中海湖心の塩分躍層以深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る。

また、アナモックス反応の中間体である NH_2OH と N_2H_4 の定量とアセチレン阻害法を併用した湖水の培養実験により、アナモックス反応と従来型の脱窒による窒素除去率を求めたところ、その比率は、6:4 であった。

中海湖心の底層は、潮汐により新鮮な日本海海水が流入することで好気的環境と嫌気的環境を繰り返しており、 NO_2^- が蓄積する世界的にも珍しい環境だといえる。中海において、境水道付近から湖心にかけての広い範囲で 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ものと推察された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 2 件)

Kato T, Sugahara S, Murakami M, Senga Y,

Egawa M, Kamiya H, Omata K, and Seike Y (2017a): Sensitive Method for the Oxidation-determination of Trace Hydroxylamine in Environmental Water Using Hypochlorite Followed by Gas Chromatography. Analytical Sciences, 33, 691-695. 査読有

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

〔学会発表〕(計2件)

加藤季晋, 菅原庄吾, 神谷宏, 江川美千子, 清家泰 (2016): 汽水湖中海の底層におけるアナモックス反応に関する研究, 第81回日本陸水学会(沖縄), 1P2, 2016年11月。(優秀賞受賞)

三輪圭哉, 菅原庄吾, 江川美千子, 清家泰 (2017): 鉄()の新規比色定量法の開発, 日本分析化学会第66年会(東京), Y3016, 2017年9月.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

清家 泰 (SEIKE, Yasushi)
島根大学・エスチュアリー研究センター・
特任教授
研究者番号: 30243421

(2) 研究分担者

菅原 庄吾 (SUGAHARA, Shogo)
島根大学・大学院総合理工学研究科・講師
研究者番号: 30721302

半田 真 (HANDA, Makoto)
島根大学・大学院総合理工学研究科・教授
研究者番号: 70208700

(3) 連携研究者

千賀 有希子 (SENGA, Yukiko)
東邦大学・理学部・准教授
研究者番号: 30434210

(4) 研究協力者

江川 美千子 (EGAWA, Michiko)
島根大学・大学院総合理工学研究科・助手
研究者番号: 20565882

加藤 晋季 (KATO, Toshikuni)
島根県保健環境科学研究所・研究員
研究者番号: 20791734

神谷 宏 (KAMIYA, Hiroshi)
島根県保健環境科学研究所・環境部長
研究者番号: 50601928

三輪 圭哉 (MIWA, Keiya)
島根大学・大学院総合理工学研究科・博士
前期課程2年