HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Coupled nitrogen and oxygen isotope effects of anaerobic ammonium oxidation (anammox) [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	小林, 香苗
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(工学)
Dissertation Number	甲第14449号
Issue Date	2021-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/81648
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	Kanae_Kobayashi_review.pdf, 審査の要旨

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学位論文審査の要旨

博士の専攻分野の名称　博士 (工学)　　氏名　小林　香苗

審査担当者　主　査　教　授　岡部 聡
副　査　教　授　木村 克輝
副　査　教　授　佐藤 久
副　査　准教授　押木 守

学位論文題名

Coupled nitrogen and oxygen isotope effects of anaerobic ammonium oxidation (anammox)
(アナモックス細菌の窒素および酸素同位体分別の解析)

窒素循環の可視化は物質循環の理解や環境保全施策策定の基盤情報として極めて重要である。窒素循環の理解および関連する生物学的反応の相対的寄与の定量的把握には, 環境中の窒素化合物の窒素安定同位体比 (δ 15N) が長年用いられてきた。近年、硝酸および亜硝酸の酸素安定同位体比 (δ 18O 値) がδ 15N 値と同様に測定可能となり、窒素と酸素の 2 軸で硝酸と亜硝酸の挙動を追跡することで、複雑な窒素循環プロセスを推定することが可能になりつつある。個々の生物学的反応の寄与率を推定するためには、各プロセスにおける安定同位体比の変化量である窒素・酸素同位体分別 (15 ε、18 ε) が必要不可欠である。硝化や脱窒反応についてはすでに多くの知見が蓄積されている。一方、多様な水圏環境で検出され海洋貧酸素環境での窒素循環にも大きく寄与していると考えられる嫌気性アンモニウム酸化 (アナモックス) 細菌については、増殖速度が遅く培養が困難であるため、これまでに淡水性アナモックス細菌の窒素同位体分別 (15 ε) が唯一報告されているのみであり、海洋性を含め多様なアナモックス細菌の窒素・酸素同位体分別に関する情報は皆無である。従って、現在、同位体化学に基づき窒素循環へのアナモックス細菌の寄与を定量することは困難である。そこで本論文では、窒素循環へのアナモックス細菌の寄与を明らかにするために、窒素・酸素同位体分別の解析を行った。

本論文は 7 章で構成されている。

第一章では、地球窒素循環の概要、関与する微生物群およびその生態、窒素循環を理解するための環境中の窒素・酸素安定同位体測定の意義および本研究の目的についてまとめている。

第二章では、窒素循環に関わる微生物の窒素・酸素同位体分別に関するこれまでに蓄積された情報の整理および窒素・酸素同位体分別に影響を及ぼす環境因子に関して文献レビューを行っている。

第三章では、3 種類のアナモックス細菌 (海洋性の “Ca. Scalindua sp.”、淡水性の “Ca. Brocadia sinica” および “Ca. Jettenia caeni”) を膜分離型連続培養リアクター (MBR) を用いて培養し、窒素同位体分別 (15 ε) を求めている。NO2- → NO3- の反応においては、これまで数例しか報告されていない重い 15N が先に反応する逆同位体分別 (ε ¡ 0) を示すことを明らかにしている (15 ε NO2- → NO3- = - 45.3　- 30.1 ‰)。NH4+ → N2 の反応では、3 種とも同様の 15 ε の値 (15 ε NH4+ → N2 = 30.9　32.7 ‰) を示した。一方、NO2- → N2 の反応では、菌種間で反応に関与する亜硝酸還元酵素の違いにより大きく異なる値を示した (15 ε NO2 → N2 = 5.9　29.5 ‰)。

第四章では、亜硝酸と硝酸の酸素同位体比 (18 δ NO2-、18 δ NO3-) に及ぼす試料水の酸素同位

体比 (18 δ H2O) の影響について定量的に検討している。亜硝酸と硝酸の酸素同位体比の測定は、アザイド法と脱窒菌法により亜硝酸と硝酸をそれぞれ N2O に変換した後、生成した N2O の酸素同位体比を測定する。そのため、試料水の酸素同位体比 (18 δ H2O) が大きく影響する。これらの検討を基に、異なる 18 δ H2O 値を有する水を用いた非生物学的な亜硝酸と水の酸素同位体交換実験より、非生物学的な NO2-と H2O の交換反応における、平衡同位体分別 (18 ε eq = 13.1 ± 0.1 ‰) および平衡速度定数 (keq = (1.13 ± 0.007) × 10-2 (h-1)) を求めている。

第五章では、異なる酸素安定同位体比に調整した重水 (H218O の比率が高い水) を用いた回分培養実験を行い、未だ報告例のないアナモックス反応の酸素同位体分別 (18 ε) を求めている。具体的には、アナモックス反応における、(1) 亜硝酸還元反応 18 ε NO2-→ N2、(2) 亜硝酸酸化反応 18 ε NO2- → NO3-、および (3) 亜硝酸酸化時の水の酸素分子の取り込み 18 ε H2O を求めている。これら 3 つの同位体分別を個々に求めることは、基質や培地組成を変化させることが難しく、経時的な基質の消費を観察できない連続培養系では不可能であった。各同位体分別は新たに開発した数値計算モデルより、(1) 18 ε NO2-→ N2= 8.4 10.0 ‰,(2) 18 ε NO2-→ NO3-= -3.0 -1.2 ‰,(3) 18 ε H2O = 25.8 27.8 ‰と算出された。18 ε NO2- → NO3-は窒素同位体分別 (15 ε) と同様に、重い同位体が先に反応する逆同位体分別を示すことを明らかにしている。

第六章では、アナモックス細菌が有する亜硝酸酸化還元酵素 (Nxr) は、酸化還元状態により NO2-の NO3-への酸化および NO3-の NO2-への還元を触媒するため、Nxr の NO2-酸化および NO3-還元反応の窒素・酸素同位体分別 (15 ε、18 ε) を、精製した Nxr を用いて個別に求めている。細胞レベルでは、NO2-酸化および NO3-還元反応が同時に生じるため、正味の窒素・酸素同位体分別 (15 ε、18 ε) しか求めることができない。実験の結果、NO2-酸化に関しては 15 ε NO2-→ NO3-= -34.7 -59.8 ‰および 18 ε NO2-→ NO3-= -19.3 -33.6 ‰、NO2-酸化に関しては、15 ε NO3-→ NO2-= 31.2 31.7 ‰および 18 ε NO3-→ NO2-= 22.0 26.0 ‰であった。NO3-還元活性は、NO2-酸化活性に比較して 23 倍低かったことより、細胞レベルでは 15 ε NO2-→ NO3 および 18 ε NO2-→ NO3-に及ぼす NO3-還元活性の影響は無視できると考えられる。

第七章では、各章の結論をまとめるとともに、得られた窒素および酸素同位体分別の窒素循環モデルへの適用および残された課題等について論じている。

以上を要するに著者は、窒素循環へのアナモックス細菌の寄与を明らかにするために, アナモックス反応の窒素・酸素同位体分別の解析に世界で初めて成功しており、水環境工学および環境微生物生態学の発展に貢献するところ大なるものがある。よって著者は、北海道大学博士 (工学) の学位を授与される資格あるものと認める。