

多摩川底質の亜酸化窒素消費ポテンシャルの体系的評価：

排水処理施設からの放流水の影響

2021年

寺田 昭彦

# 目次

<b>第 1 章 緒言</b> .....	<b>1</b>
1-1 亜酸化窒素 (N <sub>2</sub> O) .....	1
1-2 N <sub>2</sub> O の生成・消費経路 .....	1
1-3 河川からの N <sub>2</sub> O 生成・消費機構 .....	2
<b>第 2 章 目的</b> .....	<b>4</b>
<b>第 3 章 実験方法</b> .....	<b>5</b>
3-1 サンプルング地点 .....	5
3-2 サンプルング方法 .....	6
3-3 水質分析 .....	6
3-4 底質サンプルの潜在的な N <sub>2</sub> O 消費速度の評価 .....	6
3-5 <sup>15</sup> N トレーサーを用いた N <sub>2</sub> O 生成・消費速度の評価 .....	8
3-6 DNA・RNA 抽出 .....	8
3-7 定量 PCR による機能遺伝子定量 .....	9
3-8 16S RIBOSOMAL RNA 遺伝子のアンプリコン解析 .....	9
<b>第 4 章 実験結果</b> .....	<b>11</b>
4-1 サンプルング地点での水質分析結果 .....	11
4-2 河川底質の保有する潜在的な N <sub>2</sub> O 消費速度 .....	13
4-3 <sup>15</sup> N トレーサー法を用いた N <sub>2</sub> O 生成・消費速度 .....	15
4-3 定量 PCR を用いた河川底質中の機能遺伝子定量 .....	17
4-4 16S rRNA 遺伝子のアンプリコン解析による底質の微生物叢解析 .....	18
<b>第 5 章 考察</b> .....	<b>20</b>
<b>第 6 章 結言</b> .....	<b>23</b>
<b>第 7 章 計画していたが、実施・実現できなかったこと</b> .....	<b>23</b>
<b>第 8 章 今後に向けての課題</b> .....	<b>24</b>
<b>第 9 章 結果が、どのように社会に還元（活用）されるか</b> .....	<b>24</b>
謝辞 .....	25
参考文献 .....	26

## 第1章 緒言

### 1-1 亜酸化窒素 (N<sub>2</sub>O)

亜酸化窒素 (N<sub>2</sub>O) は、二酸化炭素の約 265 倍の温室効果能を有し、強力な温室効果ガスとして知られている(IPCC et al., 2014)。また、フロンに代わる 21 世紀最大のオゾン層破壊物質でもある(Ravishankara et al., 2009)。近年の N<sub>2</sub>O の排出量に関する研究によると、大気中の N<sub>2</sub>O 濃度は 1750 年の 270 ppb から 2018 年には 331 ppb まで上昇しており、1 年間で 0.2% の増加が報告されている(Tian et al., 2020)。また N<sub>2</sub>O は、農耕地、河川、海洋など様々な環境から発生し、発生量は 17.0 Mt-N/年と見積もられている(Tian et al., 2020)。

河川からの N<sub>2</sub>O 排出に目を向けると、排出量は人為的起源の約 10% を占めると報告されている (Beaulieu et al., 2011)。都市近郊の河川においては、その流域に生活排水の処理施設が存在し、処理水を河川へ放流している。これらの処理施設での窒素を含む栄養塩の除去性能は総じて高いものの、処理水濃度は河川の濃度よりも高い。これは、処理水に含まれる窒素化合物によって、放流先の水圏環境の窒素負荷が上昇することを意味する。このように水圏環境に流れた窒素化合物は微生物によって N<sub>2</sub>O に変換される。この点から、都市河川は重要な N<sub>2</sub>O 排出源 (N<sub>2</sub>O ソース) となっている (Masuda et al., 2018)。

### 1-2 N<sub>2</sub>O の生成・消費経路

Fig. 1-1 に N<sub>2</sub>O 生成および消費を含めた生成経路と各微生物による窒素変換の概略を示す。N<sub>2</sub>O の生成は、アンモニア酸化微生物によるアンモニア酸化反応の副生成物として、また、従属栄養細菌を含めた脱窒を担う微生物の中間体として生成される。N<sub>2</sub>O 生成に関与する微生物は、2015 年に発見された完全アンモニア酸化 (Complete ammonia-oxidizing, Comammox) 細菌 (Daims et al., 2015; van Kessel et al., 2015) による N<sub>2</sub>O 生成が報告され (Kits et al., 2019)、生成機構は従来想定されていたよりも多岐に渡る。N<sub>2</sub>O の排出削減のためには、微生物による反応や非生物学的な反応といった多種多様な N<sub>2</sub>O 生成を抑制させ、N<sub>2</sub>O ソースとしての排出量を削減することが一つの戦略として考えられる。一方、N<sub>2</sub>O の消費 (N<sub>2</sub>O シンク) に関しては、N<sub>2</sub>O 還元酵素を有する微生物 (Hallin et al., 2018)、特に、N<sub>2</sub>O 還元細菌の機能を利用することがもう一つの戦略として有望である (Terada, 2017)。N<sub>2</sub>O シンクの中心的役割を担う N<sub>2</sub>O 還元細菌は、N<sub>2</sub>O 還元酵素 (NosZ) を有しているが、NosZ のアミノ酸配列の違いより、Clade I および近年存在が明らかになった Clade II タイプという 2 つに大別される (Sanford et al., 2012; Jones et al., 2013)。Clade II タイプの N<sub>2</sub>O 還元細菌の脱窒反応の遺伝子型を俯瞰すると、NO<sub>3</sub><sup>-</sup> から N<sub>2</sub> までの脱窒反応を担う酵素を有する従来から知られている脱窒細菌に加え、脱窒反応の一部を担う酵素 (Fig. 1-2) が欠落しており、N<sub>2</sub>O シ

ンクとしてのみ機能する細菌群も存在する。N<sub>2</sub>O 排出削減に向けて、これらの不完全な脱窒反応を保有する N<sub>2</sub>O 還元細菌の利用が注目されている。しかしながら、Clade II タイプの N<sub>2</sub>O 還元細菌の系統や生理学的特性に関しては、まだ知見が不十分である。全球的な大気中の N<sub>2</sub>O 濃度の上昇に歯止めをかけるべく、N<sub>2</sub>O 還元細菌の生理生態に関する包括的な理解とその活性を引き出す条件の検討などが必要になっている。

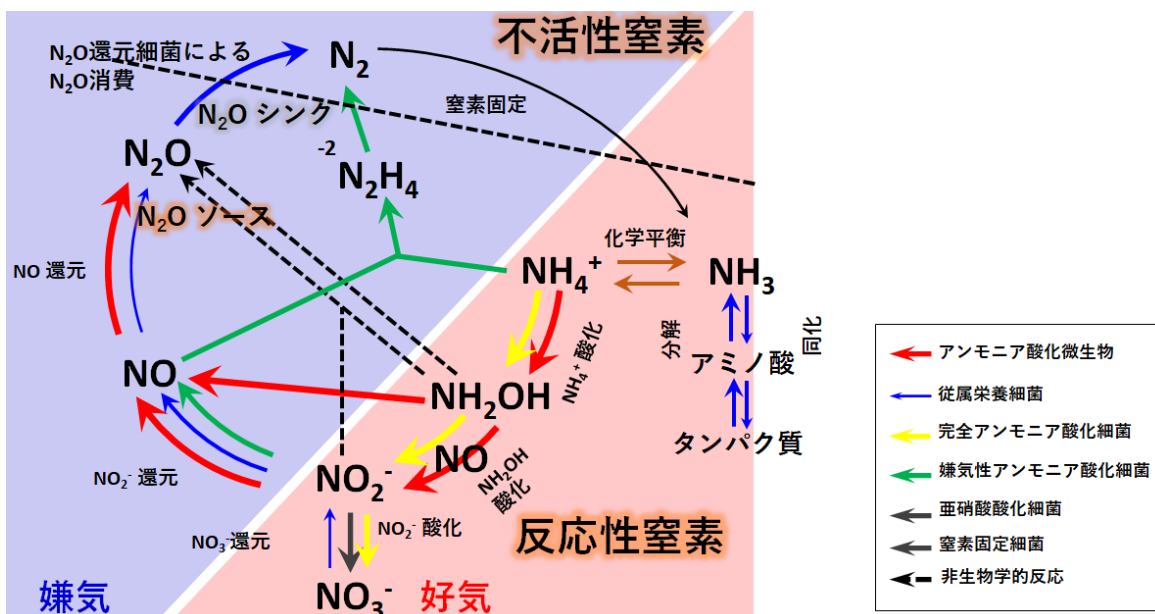


Fig. 1-1 N<sub>2</sub>O の生成および消費経路を含めた窒素循環と関与する微生物反応



Fig. 1-2 脱窒反応による窒素酸化物の還元経路と関与する酵素

### 1-3 河川からの N<sub>2</sub>O 生成・消費機構

河川からの N<sub>2</sub>O 生成機構として、Fig. 1-1 に示すヒドロキシルアミン (NH<sub>2</sub>OH) 酸化、アンモニア酸化微生物 (AOM) による硝化脱窒 (Nitrifier denitrification)、および従属栄養細菌による脱窒、といった微生物反応を介した N<sub>2</sub>O 生成が報告されている。河川底質表層の好気部位においては、溶存酸素濃度が高いことから NH<sub>2</sub>OH 酸化による N<sub>2</sub>O が支配的に起こることが考えられる。一方、深層の嫌気部位においては、脱窒細菌による脱窒反応が不完全になると、中間体として N<sub>2</sub>O が放出される。脱窒の条件が十分に整った場合、底質

深層の嫌気部位では  $\text{N}_2\text{O}$  の消費が促進される。この場合、河川底質は脱窒反応による  $\text{N}_2\text{O}$  ソースおよび  $\text{N}_2\text{O}$  シンクの双方の場となりうる。

このような河川水中および底質で起こる窒素化合物の変換速度は、その場の窒素化合物濃度や負荷に依存することが想定される。河川水の総量に対する生活排水処理施設での処理水の割合が高い都市河川においては、処理水に含まれる窒素化合物濃度が河川水のそれよりも高いことがある。この場合、生活排水処理施設の処理水放流口近傍の底質では、 $\text{N}_2\text{O}$  を含めた窒素化合物の濃度と負荷が高くなっている可能性が考えられる。つまり、 $\text{N}_2\text{O}$  還元細菌による高い  $\text{N}_2\text{O}$  消費が行なわれている場となり得る。しかしながら、都市河川の  $\text{N}_2\text{O}$  生成および消費に関する研究は、 $\text{N}_2\text{O}$  生成に関する研究が多く（例えば、Thuan et al., 2018）、河川底質が保有する潜在的な  $\text{N}_2\text{O}$  消費性能については、体系的に評価されていない。

## 第2章 目的

本研究では都市河川として多摩川に着目した。多摩川での  $N_2O$  生成や精緻な生成機構に関する研究が既に報告されている (Thuan et al., 2018)。この既往研究より、多摩川の河川底質では生成された  $N_2O$  が消費されるスポットが存在するはずであると考えた。また、そのスポットでは窒素化合物の負荷が高く、微生物反応により窒素化合物の変換が活発に起こっている、と予測した。この負荷が高い箇所として、河川水より高濃度に窒素成分を含む生活排水処理施設の処理水放流口近傍を選定した。

本研究では、多摩川的生活排水処理施設の放流口付近の底質は、 $N_2O$  を消費する細菌群が生息し、 $N_2O$  消費活性が高い、という仮説のもと、生活排水処理施設前後における微生物叢の群集構造解析、 $N_2O$  消費を担う細菌群の定量、 $N_2O$  生成・消費ポテンシャルの評価を行うことを目的とした。中流域の排水処理施設の上流地点・下流地点を含めた多摩川の河川底泥のサンプリングを行い、 $N_2O$  消費の潜在的な活性を評価した。さらに、サンプリングした底質中に棲息する微生物群の系統と機能に基づく群集構造解析として、16S rRNA 遺伝子アンプリコン解析と機能遺伝子の定量をそれぞれ実施した。

### 第3章 実験方法

#### 3-1 サンプルング地点

多摩川中流部に存在する 8 つの生活排水処理施設の上流・下流を中心にサンプリングを実施した (Fig. 3-1)。8 つの生活排水処理施設は、上流から、八王子水再生センター、多摩川上流水再生センター、浅川水再生センター、錦町下水処理場、北多摩二号水再生センター、南多摩水再生センター、北多摩一号水再生センター、等々力水処理センターである。それぞれの生活排水処理施設が HP にて公表している水質データ (2021 年 4 月現在) に関して Table 3-1 に示す。

Table 3-1 生活排水処理施設の処理水質のまとめ

生活排水処理施設	処理能力 [m <sup>3</sup> d <sup>-1</sup> ]	処理水水質 (平均) [mg L <sup>-1</sup> ]			
		BOD	COD	TN	TP
八王子水再生センター	207,800	5	8	9.7	0.7
多摩川上流水再生センター	264,700	4	8	7.7	0.3
錦町下水処理場	63,300*	15	N.A.**	N.A.	N.A.
浅川水再生センター	130,750	3	7	9.4	0.8
北多摩二号水再生センター	93,400	3	7	7.2	0.6
南多摩水再生センター	159,250	3	7	8.2	1.0
北多摩一号水再生センター	260,700	3	7	8.1	1.2
等々力水処理センター	338,500***	5	10	N.A.	1.0

\*晴天時日平均の処理水量 \*\* N. A. データ未入手 \*\*\* 日平均

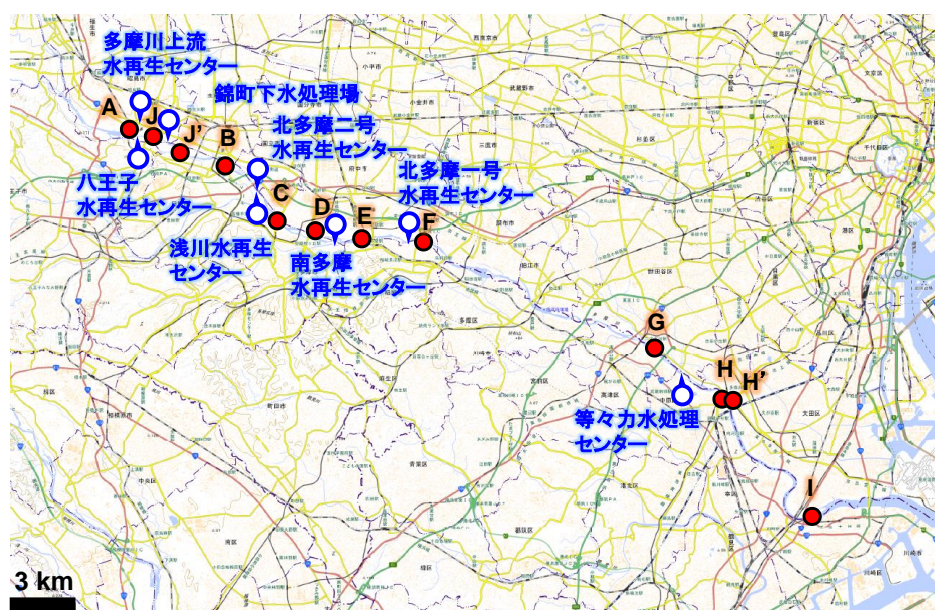


Fig. 3-1 本研究のサンプリングポイントと存在する生活排水処理施設の位置 (地図: 国土地理院ウェブサイト <https://maps.gsi.go.jp/> を加工して利用)

### 3-2 サンプルング方法

夏季、冬季、春季と異なる季節において3回のサンプルングを実施した。Fig. 3-1のA-IおよびJ, J' (春季のみ実施)の12地点から、河川水および底質のサンプルングを行った。地点H, H'については、台風の影響で護岸工事が行われており、底質の組成変化が懸念されたため、当初予定であったH地点は、冬季では近傍のH'地点からサンプルングを行った。また、春季に実施したサンプルングでは、B, D, H, H'からのサンプルングは実施せず、東京都立川市錦町付近のJ, J'地点からサンプルを新たに採取した。河川の湿潤状態の底質を採取し、遠沈管に保存した。河川水サンプルとして2L採取し、ポリ容器に保存した。これらはできる限り低温に保った状態で研究室に持ち帰り、用途に応じて保存した。底質はN<sub>2</sub>O生成もしくは消費の活性試験用とDNAおよびRNA抽出用に分注した。底質サンプルは、遠心分離機(HITACH CF16RX II, Hitachi, Japan)で9,000 rpm、2分間遠心分離を行い、上澄みを除去して使用まで4°Cで冷蔵保存した。DNA抽出用の底質は滅菌済み2 mL チューブに小分けし、使用まで-20°Cにて冷凍保存した。水サンプルは水質分析のため、0.45 μm 滅菌フィルターでろ過して遠沈管に分注し、分析まで-20°Cで冷凍保存した。また、サンプルング箇所において、水温、pH、溶存酸素濃度(DO)を測定した。春季に実施したサンプルングでは、活性のある脱窒細菌群の定量的ためRNA抽出も併せて行った。

### 3-3 水質分析

各底質採取地点の水質として、溶存有機炭素濃度(NPOC)、溶存窒素濃度(DTN)、各窒素化合物濃度(NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, NO<sub>2</sub><sup>-</sup>)を評価した。NPOCおよびDTNは0.45 μm 滅菌フィルターでろ過した河川水を全有機炭素計(TOC 5000A, Shimadzu, Japan)を用いて測定した。また、窒素化合物濃度は液体クロマトグラフィー(ICS1000 and ICS90, Thermo Fischer Scientific (Dionex), Boston, MA)によって分析した。また、河川水の溶存N<sub>2</sub>O濃度に関しては、既往の研究で利用された方法(Terada et al., 2013)を参考にして評価した。

### 3-4 底質サンプルの潜在的なN<sub>2</sub>O消費速度の評価

都市河川は、流域に存在する排水処理施設から放流される処理排水中の窒素源の影響によってN<sub>2</sub>O生成が増加する。本研究では、排水処理施設から放流される処理水に含まれる窒素化合物(特にNO<sub>3</sub><sup>-</sup>)によってN<sub>2</sub>O消費活性が上昇する、という仮説を立てた。この作業仮説の検証のため、河川底質の重量あたりの潜在的なN<sub>2</sub>O消費速度を調査する回分試験を行った。多摩川の上流から下流に点在する生活排水処理施設の上流・下流地点の底泥を中心にN<sub>2</sub>O消費活性試験を追跡することにより、流域によって底質中の微生物によるN<sub>2</sub>O消費活性に傾



向があるのか、さらに窒素化合物濃度との相関性はあるのか、という学術的な問いに答えることを目指した。

Fig. 3-1 に示すサンプリング地点から底質を採取し、実験室に持ち帰った後、遠心分離機 (HITACHI CF16RX II, HITACHI, Japan) を用いて 9,000 rpm にて 2 分間遠心分離を実施した。その後、上澄みを除去して、実験で使用するまで 4°C で保存した。N<sub>2</sub>O の消費速度を評価する実験の際、湿潤重量として底質 1.0 g を量り取って容積 120 mL のバイアルに移し、0.02×PBS 溶液を 27 mL 添加した。さらに 1.0 g/L の酵母エキス溶液を 3.0 mL 添加し、NPOC の終濃度を 0.10 g/L に調整した。有機物を外部から添加することにより、有機物が十分に存在する条件で、底泥が保有する潜在的な N<sub>2</sub>O 消費速度の最大値を見積もった。一方、有機物を添加しない、現場の有機物濃度を模擬した実験系 (未添加系) も併せて設定した。未添加系では酵母エキス溶液の代わりに 0.02×PBS 溶液を 3.0 mL 追加で添加した。バイアルにゴム栓で密閉し、その隙間から He につないだ長針を差し込んで 8 分間曝気し、バイアル内を嫌気状態とした。その後アルミシールをハンドクリンパーを用いて密閉し、He 10 mL と 5% N<sub>2</sub>O をヘッドスペースに対して 500 ppm 添加した。このバイアルを 21°C、100 rpm、暗所で振とう培養し、気相 N<sub>2</sub>O 濃度の経時変化を GC/MS (GCMS-QP2010 Ultra, Shimadzu, Japan) で測定した。さらに、底質を非添加の系を Blank 系として用意した。実験は全てのサンプルにおいて 3 連で行った。GC/MS 測定条件を Table 3-2 に示す。

Table 3-2 N<sub>2</sub>O ガス測定に用いた GC/MS の測定条件

	スプリット比	10
インジェクション部分	インジェクション量	200 μL
	温度	100°C
GC 分離部	全流量	25.3 mL/min
	圧力	38.0 kPa
	カラム流量	2.03 mL/min
	線速度	56.6 cm/s
	温度プログラム	50°C (1.4 min)
MS 検出部	イオン源温度	200°C
	インターフェース温度	250°C
	検出器電圧	1.2 kV
	検出モード	SIM

### 3-5 <sup>15</sup>N トレーサーを用いた N<sub>2</sub>O 生成・消費速度の評価

春季のサンプルにおいては、3-4 で示した底質の調整を行ったのち、各バイアルに酵母エキス由来の有機物を添加し、河川水サンプルに含まれる窒素酸化物を完全に還元し、窒素ガスに転換させた。窒素酸化物が無い状態にしたのち、Table 3-3 に示す 3 つの異なる条件に添加し、脱窒由来の潜在的な N<sub>2</sub>O 生成速度、N<sub>2</sub>O 消費速度の評価を行った。この回分試験により生成された分子量 (*m/z*) 44, 45, 46 のガス態 N<sub>2</sub>O 濃度、*m/z* 29, 30 のガス態 N<sub>2</sub> 濃度を時系列的に追跡した。なお、Table 3-3 に適用したサンプルは、上流から Fig. 3-1 に示す地点 A, I, I', C, E, F の 6 地点である。ガス態の N<sub>2</sub>O 濃度測定には Table 3-2 で示す実験条件で測定を行った。

Table 3-3 <sup>15</sup>N トレーサーを用いた回分試験

Run	添加物	目的
Run 1	ヘッドスペースに分子量 44 の N <sub>2</sub> O ( <sup>44</sup> N <sub>2</sub> O)濃度 400 ppm になるように N <sub>2</sub> O ガスを添加。	GC/MS で <sup>44</sup> N <sub>2</sub> O の減少量を測定し、 <sup>44</sup> N <sub>2</sub> O の減少速度から潜在的な N <sub>2</sub> O 消費速度を算出。
Run 2	<sup>15</sup> NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> 濃度 5 mg-N/L となるように <sup>15</sup> NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> を河川水に添加。	GC/MS で単位時間当たりの <sup>46</sup> N <sub>2</sub> O と <sup>30</sup> N <sub>2</sub> の増加量を測定し、N <sub>2</sub> O 生成速度を算出。 (N <sub>2</sub> O 生成速度) = ( <sup>46</sup> N <sub>2</sub> O 生成速度) + ( <sup>30</sup> N <sub>2</sub> 生成速度)
Run 3	ヘッドスペースに <sup>44</sup> N <sub>2</sub> O 濃度 400 ppm、 <sup>15</sup> NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> 濃度 5 mg-N/L となるように <sup>15</sup> NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> を河川水に添加。	GC/MS で単位時間当たりの <sup>44</sup> N <sub>2</sub> O, <sup>46</sup> N <sub>2</sub> O, <sup>30</sup> N <sub>2</sub> の増加量を測定し、NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> と N <sub>2</sub> O の 2 つの電子受容体が共存する条件下における N <sub>2</sub> O 消費速度を算出。 (N <sub>2</sub> O 消費速度) = ( <sup>44</sup> N <sub>2</sub> O 減少速度) + ( <sup>30</sup> N <sub>2</sub> 生成速度)

### 3-6 DNA・RNA 抽出

DNA 抽出に関しては、各サンプリング地点で採取したサンプルを氷冷した状態で実験室に持ち帰り、DNA 抽出時まで -20°C で冷凍保存した。常温解凍したサンプルを 12,000 rpm, 4°C にて 5 分間遠心分離を行い、上澄みを除去した。FastDNA Spin Kit for Soil (MP Biomedicals, CA) を用いて、DNA 抽出を行った。抽出の詳細は DNA 抽出キットのプロトコルに従った。抽出 DNA は Nanodrop 2000c (Thermo Scientific, USA) で DNA 濃度および純度 (260/280 nm) を測定し、DNA 濃度 2 ng/μL になるように希釈して -20°C で保存し、各種分子生物学分析に使用した。

春季のサンプリングでは RNA 抽出を行った。各サンプリング地点で採取したサンプルを RNA 安定化溶液 (RNAlater<sup>®</sup>, Thermo Fisher Scientific, MA) に浸漬さ

せ、4°Cにて1日保存した。その後、RNA抽出まで-20°Cで保存した。RNA抽出の際は、遠心分離機を用いて12,000 rpmで5分遠心分離を行い、FastRNA Pro Blue kit (MP Biomedicals, CA)を用いてRNA抽出を行った。抽出の詳細はRNA抽出キットのプロトコルに従った。抽出したRNAはQubit RNA HS assay kit (Thermo Fisher Scientific, MA)を用いて定量を行った後、QuantiTect Reverse Transcription Kit (QIAGEN, Hilden, Germany)を用いた逆転写反応によりcDNAを作製した。

### 3-7 定量PCRによる機能遺伝子定量

抽出したDNAおよび逆転写反応により作成したcDNAは定量PCRを行い、16S rRNA遺伝子および各窒素化合物の変換を担う酵素をコードした機能遺伝子の定量を行った。用いたプライマーの塩基配列をTable 3-4に示す。定量PCRの条件に関しては、Table 3-4に示す既往研究の実験条件を採用した。

**Table 3-4 定量PCRで用いたプライマーセットと塩基配列**

Primer	Target	Sequence (5'-3')	References
1055f	16S rRNA	ATGGCTGTCGTCAGCT	(Ferris et al., 1996)
1392r		ACGGGCGGTGTGTAC	(Lane, 1991)
nirS 4QF	<i>nirS</i>	G TSAACGYSAAGGARACSGG	(Throbäck et al., 2004)
nirS4QR		GASTTCGGRTGSGTCTTSAYGAA	
nirK876-F	<i>nirK</i>	ATYGGCGGVCA YGGCGA	(Henry et al., 2004)
nirK1040-R		GCCTCGATCAGRTRRTGGTT	
nosZ2F	<i>nosZ</i> clade I	CGCRACGGCAASAAGGTSMSST	(Henry et al., 2006)
nosZ2R		CAKRTGCAKSGCRTGGCAGAA	
nosZ-II-F	<i>nosZ</i> clade II	CTIGGICCIYTKAYAC	(Jones et al., 2013)
nosZ-II-R		GCIGARCARA AITCBGTRC	
amoA1f	<i>Bacterial amoA</i>	GGGGTTTCTACTGGTGGT	(Rotthauwe et al., 1997)
amoA2r		CCCCTCKGSAAAGCCTTCTTC	
cmx_amoB-148F	Comammox <i>amoB</i>	TGGTAYGAYACNGAATGGG	(Cotto et al., 2020)
cmx_amoB_485R		CCCGTGATRTCCATCCA	

### 3-8 16S ribosomal RNA 遺伝子のアンプリコン解析

各サンプリング箇所の微生物叢を解析するために夏季、冬季の底質サンプルに関しては16S rRNA遺伝子に基づいたアンプリコン解析を行った。既往研究の方法 (Caporaso et al., 2011) を参考に16S rRNA遺伝子のV4可変領域をターゲットとする515f-806rのプライマーセットを用い、3-6に示す抽出DNAを増幅させ

た。DNA 濃度は Qubit fluorometer (Life technologies, CA) と Nanodrop 3300 (Thermo Fisher Scientific, MA) にて測定を行った。シーケンシングとその後の系統解析に関しては、既往の研究 (Suenaga et al., 2019) で採用した方法に準拠して行った。この解析において、存在量が多い微生物に関しては、Blast (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) で近縁種を同定した後、KEGG (<https://www.kegg.jp/kegg/kegg2.html>) (Kanehisa and Goto, 2000) で窒素化合物の代謝に関連する遺伝子の有無を判別し、N<sub>2</sub>O 生成もしくは消費を行う細菌群であることを類推した。

## 第4章 実験結果

### 4-1 サンプルング地点での水質分析結果

各サンプルング地点における NPOC 濃度を Fig. 4-1, Fig. 4-2 に示す。多摩川流域において有機物画分は検出下限になることが想定されたが、有機物濃度は 10 mg-C/L 前後を推移した。多摩川河口に向かうにつれ、NPOC 濃度が高くなる傾向を示した。また、夏季・冬季において NPOC 濃度に大きな違いは見受けられなかった (Fig. 4-1)。一方、春季の NPOC 濃度は全体的に低い値となった (Fig. 4-2)。

窒素化合物濃度の結果を Fig. 4-3 に示す。窒素の内訳を確認すると、ほとんどの画分が硝酸イオンであることが示された。また、夏季・冬季のサンプルに共通して、下流に向かうにつれて高い濃度になることが明らかになった。

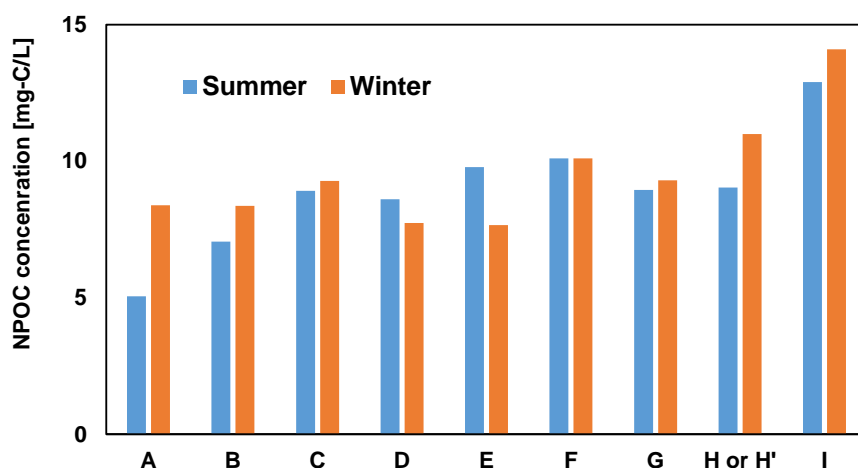


Fig. 4-1 各サンプルング地点における NPOC 濃度の推移 (夏季・冬季)

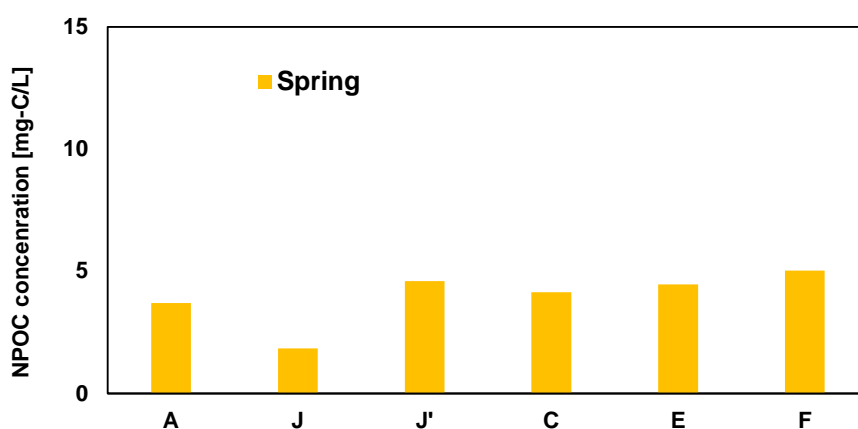


Fig. 4-2 各サンプルング地点における NPOC 濃度の推移 (春季)

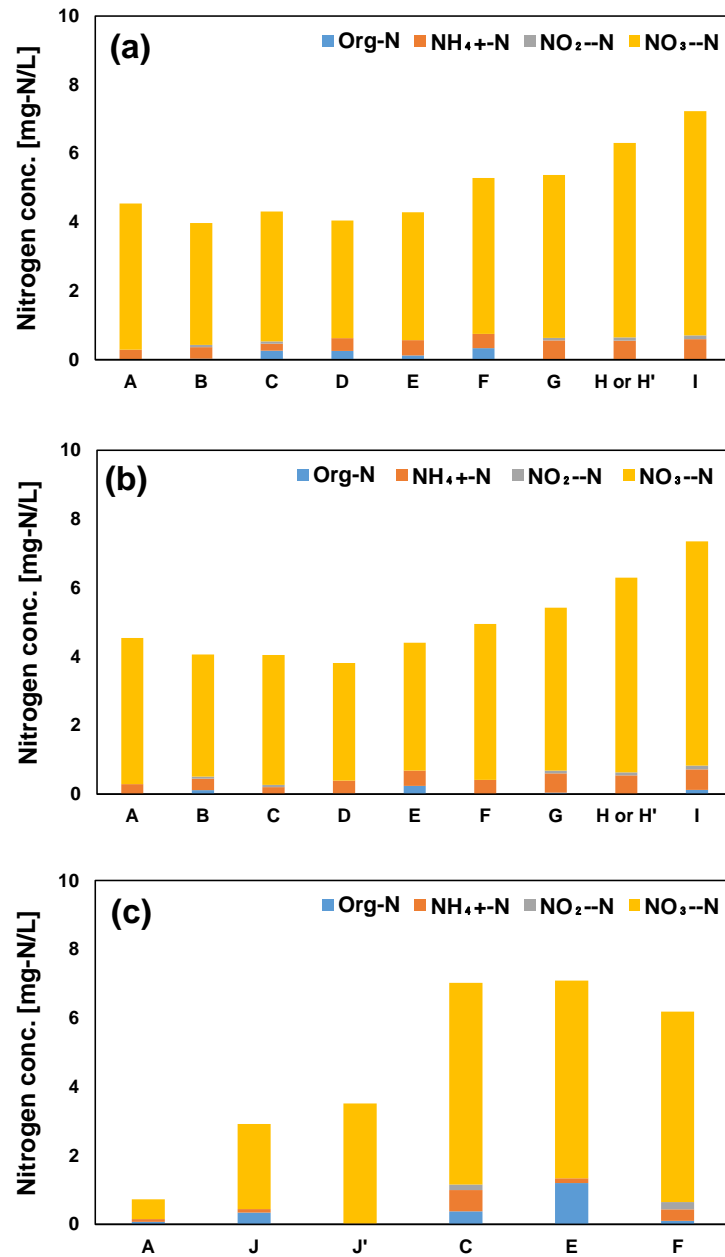


Fig. 4-3 各サンプリング地点における窒素化合物濃度の推移：  
(a) 夏季、(b) 冬季、(c) 春季

各地点の DO, pH を比較すると、地点間、季節による大きな違いはなかった。また、水温に関して夏季と冬季を比較すると、全ての地点において 10°C 以上の差が見られた (データ未掲載)。サンプリング地点間では、春季の F 地点を除き、排水処理施設の下流、放流口に近い地点 (地点 K', 地点 F) は高い傾向を示した。

各サンプリング地点の河川水における溶存 N<sub>2</sub>O 濃度は、例外的に高い溶存 N<sub>2</sub>O 濃度が得られた春季の C 地点を除き、数 10 nmol/L であった (Fig. 4-4)。これら

の濃度範囲は多摩川の溶存  $\text{N}_2\text{O}$  濃度を測定した既往の研究 (Thuan et al., 2018) と近いものとなった。また、溶存  $\text{N}_2\text{O}$  濃度は下流に向かうほど上昇する傾向を示し、夏季よりも冬季の方が高濃度であることも確認された (Fig. 4-4)。既往の報告 (Masuda et al., 2018) と同様に、脱窒の中間体として  $\text{N}_2\text{O}$  が生成された可能性が示唆された。

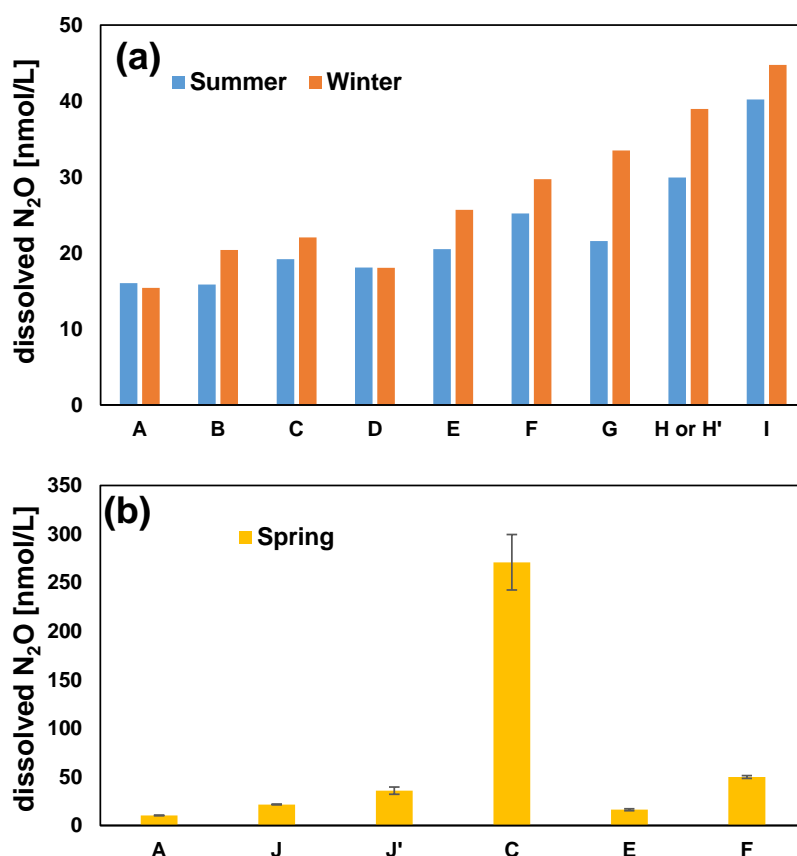


Fig. 4-4 各サンプリング地点における溶存  $\text{N}_2\text{O}$  濃度の推移：  
(a) 夏季・冬季、(b) 春季

#### 4-2 河川底質の保有する潜在的な $\text{N}_2\text{O}$ 消費速度

底質サンプルによる  $\text{N}_2\text{O}$  消費の時系列的変化の一例を Fig. 4-5 に示す。酵母エキスを投入した系 (Fig. 4-5 (a)) では、サンプリング地点 D, E, F の底質サンプルにおいて  $\text{N}_2\text{O}$  濃度が減少した。一方、河川水のみ  $\text{N}_2\text{O}$  を投入した系 (酵母エキス未添加) では、 $\text{N}_2\text{O}$  濃度低下は観察されなかった。したがって、Fig. 4-1 に示す NPOC の濃度測定で示された有機物画分は、 $\text{N}_2\text{O}$  の電子供与体として利用できない可能性が示唆された。Fig. 4-5 (a) で得られた  $\text{N}_2\text{O}$  濃度減少のプロファイルから、最も直線性が高い区間の傾きを求め、底質重量当たりの潜在的な  $\text{N}_2\text{O}$  消費速度を算出した (Table 4-1)。多摩川流域の河川底質における潜在的な

N<sub>2</sub>O 消費速度は、下流に向かうほど高くなることが明らかになった。さらに、生活排水処理施設の前後の比較を行うと、中流・下流付近の生活排水処理施設の前後である E と F および G と H (or H') の底質サンプルにおいて、N<sub>2</sub>O 消費活性に差が見られた。この結果は、生活排水処理施設の処理水に含まれる窒素酸化物により、河川底質の N<sub>2</sub>O 消費活性が高まっていることを示唆している。

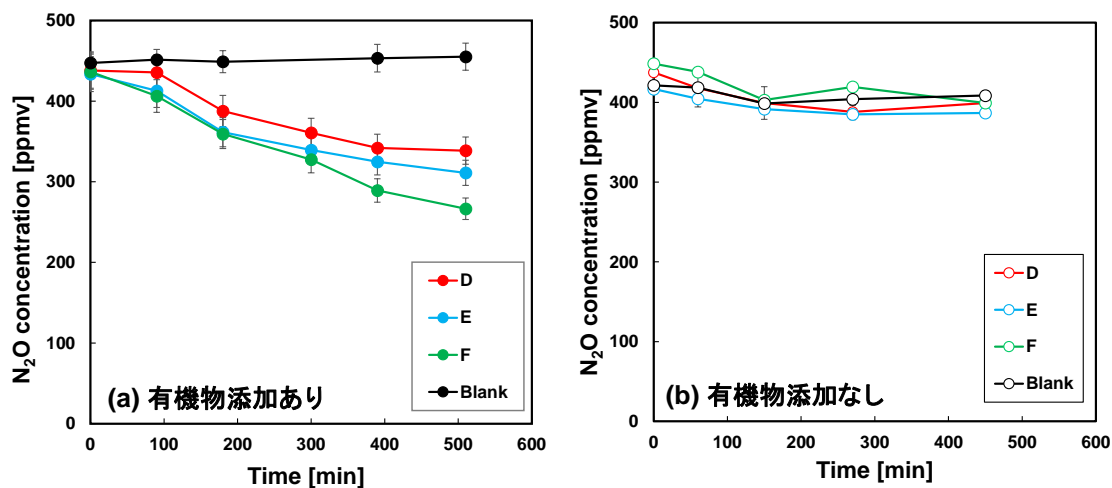


Fig. 4-5 N<sub>2</sub>O 消費の時系列的な変化：(a) 酵母エキスの外部添加あり、(b) 外部有機炭素の添加なし

Table 4-1 各サンプリング地点における潜在的な N<sub>2</sub>O 消費速度

サンプリング地点	潜在的な N <sub>2</sub> O 消費速度 [mg-N/kg/day]	
	夏季	冬季
A	14.79	19.56
B	18.47	15.37
C	16.68	20.11
D	26.86	15.17
E	31.87	24.57
F	35.77	36.49
G	28.97	27.90
H or H'	48.00	40.69
I	60.62	47.04



### 4-3 $^{15}\text{N}$ トレーサー法を用いた $\text{N}_2\text{O}$ 生成・消費速度

春季に採取した河川底質サンプルにおいて、 $^{15}\text{N}$  トレーサーを用いた回分試験を行った。Table 3-3 で示す実験条件における底質の  $\text{N}_2\text{O}$  生成および消費活性の結果を Fig. 4-6 に示す。 $\text{N}_2\text{O}$  をヘッドスペースに充填させ、潜在的な最大  $\text{N}_2\text{O}$  消費速度を評価した Run 1 (Fig. 4-6 (a)) では、錦町下水処理場を間に挟んだ上流 (J 地点) と下流 (J' 地点)、北多摩一号水再生センターを間に挟んだ上流 (E 地点) と下流 (F 地点) において底質における  $\text{N}_2\text{O}$  消費活性がそれぞれ 1.6 倍、2.2 倍上昇する結果が得られた。

$\text{N}_2\text{O}$  の蓄積と消費した  $\text{N}_2\text{O}$  を加算した潜在的な  $\text{N}_2\text{O}$  生成速度を評価した Run 2 (Fig. 4-6 (b)) では、J 地点と J' 地点で有意な差は見られなかった。一方、E 地点と F 地点で 31 倍という大きな活性差がみられた。これまで大きな差が生じた原因は不明であるが、 $\text{N}_2\text{O}$  生成速度は  $\text{N}_2\text{O}$  消費速度に対して小さい値を取ることが示された。

$\text{NO}_3^-$  存在下での潜在的な  $\text{N}_2\text{O}$  消費速度を評価した Run 3 (Fig. 4-6 (c)) では、Run 2 と同様の結果を示し、J 地点と J' 地点で有意な差は見られず、E 地点と F 地点で有意な差が見られた。

Run 2 と Run 3 の相対速度を評価するため、 $\text{N}_2\text{O}$  生成に対する  $\text{N}_2\text{O}$  消費の相対活性を算出した。その結果を Fig. 4-7 に示す。錦町下水処理場を間に挟んだ上流 (J 地点) と下流 (J' 地点)、および北多摩一号水再生センターを間に挟んだ上流 (E 地点) と下流 (F 地点) においては、相対的な  $\text{N}_2\text{O}$  消費速度は上流の方が高くなる傾向が示された。2 点の生活排水処理施設のみの評価になっているため、更なる検討が必要であるが、生活排水処理施設の下流では、 $\text{N}_2\text{O}$  消費速度だけでなく、 $\text{N}_2\text{O}$  生成速度も上昇し、 $\text{N}_2\text{O}$  を巡る代謝活性が増大することが示唆された。

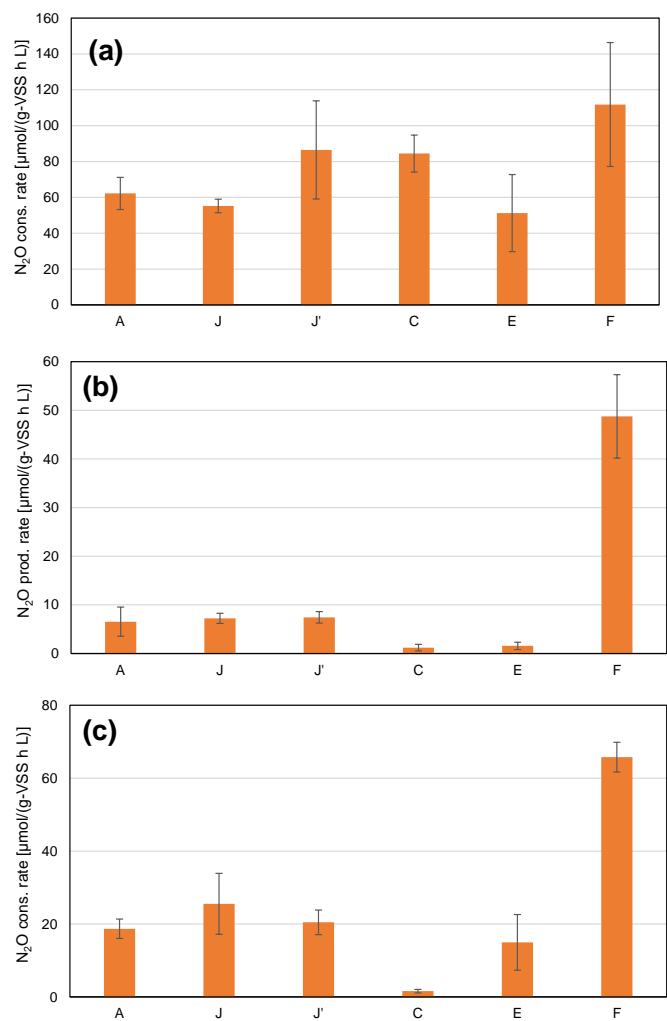


Fig. 4-6  $^{15}\text{N}$  トレーサーを用いた河川底質の  $\text{N}_2\text{O}$  生成・消費活性 : (a)  $\text{N}_2\text{O}$  のみを添加した潜在的な  $\text{N}_2\text{O}$  消費速度, (b)  $\text{NO}_3^-$  のみを添加した  $\text{N}_2\text{O}$  生成速度, (c)  $\text{NO}_3^-$  と  $\text{N}_2\text{O}$  の双方を添加した電子受容体の競合下での潜在的な  $\text{N}_2\text{O}$  消費速度

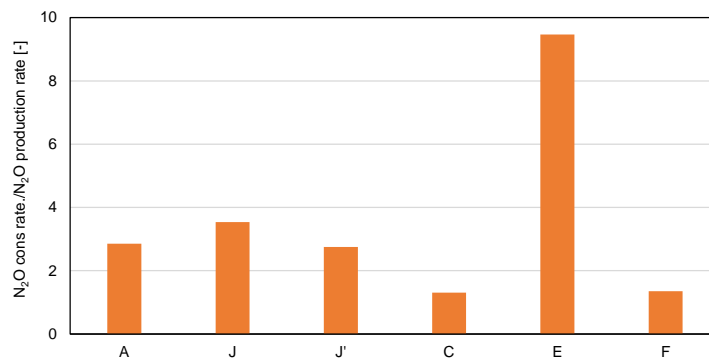


Fig. 4-7 各サンプリング地点における  $\text{N}_2\text{O}$  生成速度に対する相対的な  $\text{N}_2\text{O}$  消費速度

### 4-3 定量 PCR を用いた河川底質中の機能遺伝子定量

定量 PCR の結果を Fig. 4-8 に示す。春季のサンプルに関しては PCR の増幅効率に問題が発生し、遺伝子コピー数が検量線の検出下限値以下になってしまった。河川土質の違いや阻害物質が PCR の増幅効率を低減させた可能性が考えられるが、原因は現時点では明らかになっていない。したがって、夏季・冬季の結果のみを示す。アンモニア酸化酵素をコードする機能遺伝子 *amo* のコピー数を比較すると、従来から知られているアンモニア酸化細菌の機能遺伝子 *amoA* よりも、近年存在が明らかになった完全アンモニア酸化細菌 *Nitrospira* の *amoB* の遺伝子の方が、全てのサンプル地点でコピー数が大きくなる結果が得られた (Fig. 4-8 (a))。また、各サンプル日による機能遺伝子のコピー数に顕著な違いは見られなかった。

一方、脱窒に関連する機能遺伝子のコピー数を確認すると、亜硝酸還元酵素をコードする *nirS*, *nirK* においてはサンプリングの季節に拘わらず、*nirK* の方が大きくなることが明らかになった (Fig. 4-8 (b))。サンプリング地点でこれらの機能遺伝子のコピー数に顕著な傾向は見られなかった。

一酸化窒素の還元酵素をコードする機能遺伝子 *qnorB* および *cnorB* について確認すると、*qnorB* 遺伝子の方が *cnorB* 遺伝子よりも大きいコピー数を示した (Fig. 4-8 (c))。一方で、サンプリング地点で大きな違いは見られなかった。

N<sub>2</sub>O 還元酵素をコードする機能遺伝子 *nosZ* clade I および *nosZ* clade II について確認すると、*nosZ* clade II 遺伝子の方が、*nosZ* clade I 遺伝子より大きいコピー数を示した。

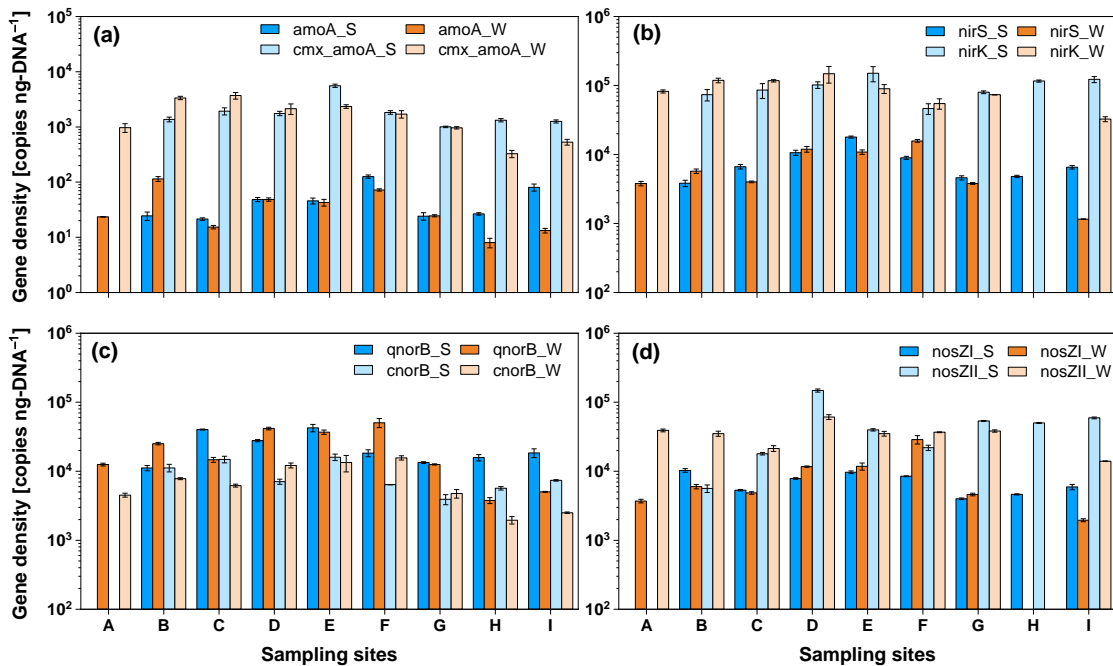


Fig. 4-8 夏季 (S)、冬季 (W) の河川底質サンプルの定量 PCR の結果:  
 (a) Proteobacteria に属するアンモニア酸化細菌の機能遺伝子 *amoA* および完全アンモニア酸化細菌 (Comammox 細菌)由来の機能遺伝子 *amoB*  
 (b) 亜硝酸還元酵素をコードした機能遺伝子 *nirS* および *nirK*  
 (c) 一酸化窒素還元酵素をコードした機能遺伝子 *qnorB* および *cnorB*  
 (d) N<sub>2</sub>O 還元酵素をコードした機能遺伝子 *nosZ* clade I および *nosZ* clade II

#### 4-4 16S rRNA 遺伝子のアンプリコン解析による底質の微生物叢解析

夏季および冬季の時点での 16S rRNA 遺伝子に基づく微生物叢を門レベルおよび Operational Taxonomic Unit (OTU) レベルで評価した。その結果を Fig. 4-9 と Fig. 4-10 にそれぞれ示す。門レベルの微生物叢解析の結果、同サンプリング地点における季節間の違いは大きくなく、一方で、上流から下流に向けて微生物群集構造が変遷する傾向が得られた。特に、E, F 地点から大きな変遷があることが示唆された。また、門レベルの解析で大部分を占めるのは、従前から知られている脱窒細菌が属する Proteobacteria 門であった。

更に微生物群集を細かな分類体系で確認した OTU レベルでの微生物叢解析では、サンプリング地点で大きな違いを示した。N<sub>2</sub>O 消費性能を保有する脱窒細菌として検出されている *Pseudomonas* 属、*Flavobacterium* 属、*Rhodocyclaceae* 科 (Fig. 4-10 には反映されず) などが検出された。また、排水処理施設の曝気槽では存在割合が極めて低い特徴的な種類が検出され、底質由来の種が検出された

可能性が示唆された。

さらに、アンモニア酸化微生物や亜硝酸酸化細菌などの硝化を担う微生物群に着目すると、アンモニア酸化古細菌や Proteobacteria 由来のアンモニア酸化細菌群に対し、*Nitrospira* 属に近縁な種類が多く有意に高い存在比率で検出された。また、*Nitrospira* 属の相対存在率は、F, G, H, I などの下流域で高い傾向を示した。

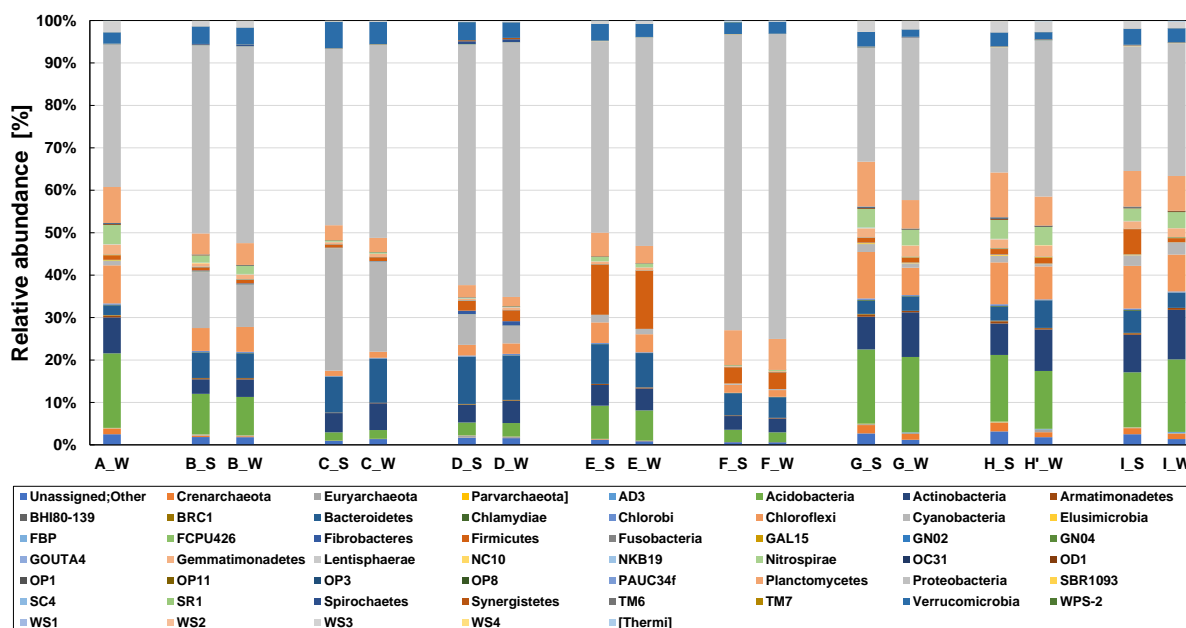


Fig. 4-9 16S rRNA 遺伝子に基づく門レベルの微生物叢解析 (S: 夏季, W: 冬季)

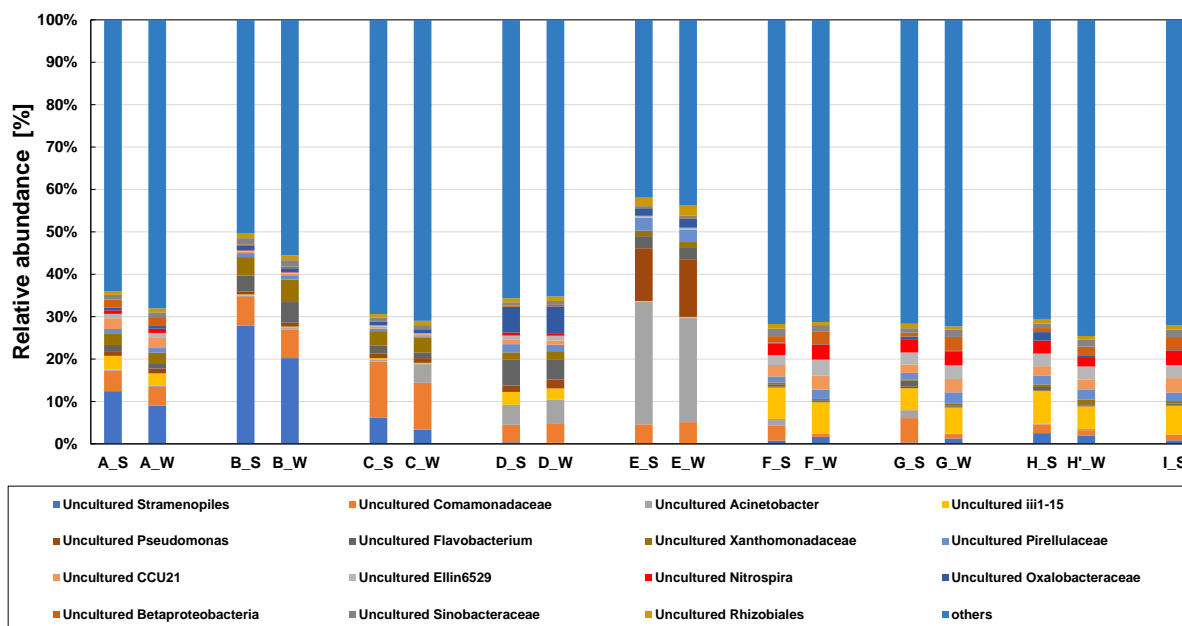


Fig. 4-10 16S rRNA 遺伝子に基づく OTU レベルの微生物叢 (S: 夏季, W: 冬季)

## 第5章 考察

本研究では、生活排水処理施設の処理水が河川水の大部分を占める都市河川である多摩川の流域における  $N_2O$  消費に関する微生物の活性や種類に関して研究をまとめた。生活排水処理施設の放流口近傍では窒素濃度が高くなる傾向にあることを示した。処理水が合流する箇所は、窒素化合物の負荷が高くなる場所と言い換えることもでき、微生物の活性が高いホットスポットとなり得る。本研究により、硝酸イオン濃度は、下流に向かうにつれ (Fig. 4-3)、生活排水処理施設の上流・下流 (J と J', E と F, G と H (or H')) において上昇する傾向を示した (ただし、春季の E と F は例外的に逆の傾向を示している。)。また、溶存態の  $N_2O$  濃度に関しても同様の傾向が得られており、上流から下流に向けて (A→I) 溶存  $N_2O$  濃度が上昇した (Fig. 4-4)。

各サンプリング地点から採取した河川底泥の潜在的な  $N_2O$  消費速度を確認すると、下流に向かうにつれて  $N_2O$  消費活性が増大することが示された (Table 4-1)。この結果は、生活排水処理施設の処理水により増加する硝酸イオンを主成分とする窒素化合物が、放流口付近の河川底質と、河川下流の底質の  $N_2O$  消費活性を増大させること示唆するデータとなる。すなわち、本研究の仮説である、多摩川の生活排水処理施設の放流口付近の底質は、 $N_2O$  を消費する細菌群が生息し、 $N_2O$  消費活性が高い、ことを支持する結果であることが示された。

また、本研究では  $^{15}N$  トレーサー法を用い、嫌気条件における脱窒由来の  $N_2O$  生成速度、 $N_2O$  消費速度の比較を実施した。コロナウイルス感染症拡大による研究計画の遅延により更なる検討が必要であるものの、生活排水処理施設の放流口付近 (J'および F) では、 $N_2O$  消費速度の増大に加え、 $N_2O$  生成速度の増大も示されており (Fig. 4-6 (b))、状況によっては  $N_2O$  ソースになりうる可能性も示唆された。今回の  $N_2O$  生成・消費試験では外部から酵母エキスを導入して速度を精査しているものの、実際の河川水では有機物は限られている (Fig. 4-1, Fig. 4-2)。また、河川水を用いた  $N_2O$  消費試験では  $N_2O$  消費がほとんど進まない可能性が示されている (Fig. 4-5 (b))。したがって、今後は長期間培養を通した外部有機炭素源のない実験系での  $N_2O$  生成・ $N_2O$  消費性能を包括的に評価する必要がある。

脱窒酵素をコードした機能遺伝子の定量により、 $N_2O$  消費を担う細菌群の評価により、clade II タイプの *nosZ* 遺伝子が clade I タイプよりも高密度に存在することが示唆された (Fig. 4-8 (d))。Clade II タイプの *nosZ* 遺伝子を保有する細菌は、 $N_2O$  に対する親和性が高いことが報告されている (Yoon et al., 2016)。また、酸素に対して  $N_2O$  還元性能が失活しにくい耐性が高い種類も存在しており (Suenaga et al., 2018; Suenaga et al., 2019)、今後メタゲノム解析等の高解像度の微生物生態に関する解析を実施し、機能と活性の双方から河川底質に生息する  $N_2O$

還元細菌の理解を進めていきたいと考えている。

また、 $N_2O$  生成に関与するアンモニア酸化微生物 (AOM) の定量として、Proteobacteria 由来の *amoA* 遺伝子と、近年存在が明らかになった完全アンモニア酸化細菌 *Nitrospira* に帰属する Comammox 細菌由来の *amoB* 遺伝子の定量を行った。その結果、河川底質に生息するアンモニア酸化細菌 (AOB) は Comammox 細菌が優占的であることを実証した (Fig. 4-8 (a))。Comammox 細菌は、従来のアンモニア酸化細菌と比較して、アンモニアに対して親和性が高く (Kits et al., 2017)、副次的に発生する  $N_2O$  の生成量も低い (Kits et al., 2019)。Comammox が主たる AOM として河川底質に生息していることにより  $N_2O$  の生成が少ないのか、効率的にアンモニアを硝酸イオンに変換されているのか、その存在意義に関しても今後の検討としていきたい。

16S rRNA 遺伝子に基づく各サンプリング地点の微生物叢解析の結果、微生物叢が大きく異なることが示唆された。また、Comammox 細菌由来の *amoB* 遺伝子定量の傾向と同様に *Nitrospira* 属が検出された (Fig. 4-10)。*Nitrospira* 属が新奇の AOB なのか、従前から報告されている亜硝酸酸化細菌なのか、16S rRNA 遺伝子の同定からは明らかにできないが、定量 PCR の結果と合わせると、検出された *Nitrospira* 属は Comammox である可能性もある。特に下流部において *Nitrospira* 属が高い存在比率を示していることを鑑みると、下流部では Comammox 細菌が窒素循環に関与しているかもしれない。今後の新たな学術的問いとして取り組むべき課題となった。

得られた OTU レベルでの微生物叢解析から、Blast と KEGG を用いた脱窒に関連する遺伝子解析の結果、多摩川の底質に生息する脱窒に関与する細菌は Table 5-1 に示す 3 つに遺伝子型に分類される。Table 5-1 の分類 1 の細菌群が  $N_2O$  消費能を発現するような条件を見出すことが、河川からの  $N_2O$  排出を削減するためには重要と考えられる。また、分類 2 の細菌群の場合、 $N_2O$  消費能が減速し、 $N_2O$  生成能が増大すると、 $N_2O$  ソースとして機能してしまうため、注意が必要である。一方、分類 3 の細菌群の場合、 $N_2O$  が窒素変換の最終生成物となってしまうため、常に  $N_2O$  ソースとして機能してしまう。これらの細菌群の活性上昇は、 $N_2O$  排出の増大に寄与してしまうことが懸念される。脱窒細菌の遺伝子型に基づいた分類により、 $N_2O$  排出削減に寄与できそうな有望な  $N_2O$  還元細菌を割り出すことが出来た。例えば、分類 1 では Betaproteobacteria 綱や Alphaproteobacteria 綱に属する生活排水処理施設でも検出される脱窒細菌群が検出された。分類 3 では、Comammox 細菌の可能性も考えられる *Nitrospira* 属に加え、アンモニア酸化古細菌として知られる *Ca. Nitrosphaera* 属も検出された。脱窒細菌のみならず、硝化に関与する微生物群も  $N_2O$  生成に関与することが示唆された。

今後は河川底質の長期集積培養を行うことにより、温室効果ガス削減に有力な N<sub>2</sub>O 還元細菌の集積・分離培養に展開していきたい。

**Table 5-1 Blast と KEGG による脱窒細菌の遺伝子型の分類**

分類	遺伝子型より想定される表現型	検出された微生物群
1	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> →NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> →NO→N <sub>2</sub> O のいずれかの経路を担う酵素をコードする遺伝子が無い。一方、N <sub>2</sub> O 還元酵素をコードする遺伝子を有している →N <sub>2</sub> O シンクとして機能	<i>Gemmatimonas</i> 属 <i>Opiritatus</i> 属 など
2	脱窒酵素をコードする遺伝子を全て有している →N <sub>2</sub> O ソース・シンク双方として機能	<i>Hyphomicrobium</i> 属 <i>Rhodocyclaceae</i> 科 など
3	N <sub>2</sub> O 還元酵素を有していない →N <sub>2</sub> O ソースとして機能	<i>Ca. Nitrososphaera Gemmata</i> 属 <i>Nitrospira</i> 属 <i>Stenotrophomonas</i> 属 <i>Turnerilla</i> 属 など



## 第6章 結言

本研究は、生活排水処理施設が立地する多摩川中流域において、河川水・底質を採取し、潜在的な N<sub>2</sub>O 消費活性および微生物の機能遺伝子量や種類を同定することにより、底質が有する N<sub>2</sub>O 削減のポテンシャルを評価したものである。得られた結果は以下にまとめることができる。

- 多摩川中流域から下流に向かうにつれ、溶存 N<sub>2</sub>O および窒素酸化物濃度が增大していることが示された。
- 多摩川中流域に立地している生活排水処理施設からの処理水の流出により、近傍の底質において N<sub>2</sub>O 消費活性が増大することが明らかになった。
- 処理水の流出は河川底質の N<sub>2</sub>O 消費の活性だけでなく、N<sub>2</sub>O 生成の活性の増大にも寄与しており、底質の微生物活性が全体的に増大する可能性が示された。
- 河川底質の N<sub>2</sub>O 還元を行うことができる細菌群は *nosZ* clade II タイプが存在量として多いことが明らかになった。
- アンモニア酸化を担う細菌群として完全アンモニア酸化細菌が、従来のアンモニア酸化細菌よりも高い遺伝子コピー数で検出された。

## 第7章 計画していたが、実施・実現できなかったこと

本研究の計画していたものの実施できなかったことを以下に示す。

- 新型コロナウイルスの蔓延による研究活動制限に伴い、河川サンプリングおよび N<sub>2</sub>O 生成・消費活性試験を予定通りに実施することが出来なかった。したがって、四季を通じた河川底質の N<sub>2</sub>O 生成・消費に関する活性や、微生物叢の変遷を体系的に評価するに至らなかった。
- N<sub>2</sub>O 生成・消費に関する細菌群の遺伝子転写活性の定量や、転写活性の高い種類の同定が十分に行えなかった。RNA の保存、抽出方法、定量手法の最適化に予想以上の時間を要したためである。用いた手法は研究室で従来から行っているものであったものの、河川底質に含まれる阻害物質に対するノウハウが限られていたため、前もって検討すべき事項であった。

## 第 8 章 今後に向けての課題

本研究の課題として、以下の点が挙げられる。

- 河川底質の土質や金属の組成が非生物学的な  $N_2O$  生成に及ぼす影響の評価が今後の検討課題である。今回の検討では、各サンプリング地点で出来る限り粘土質の底質を採取したものの、底質の組成に関連する考察が加えられていない現状がある。今後は、組成解析の結果に基づき、底質組成の違いが  $N_2O$  生成・消費活性にどのように影響を及ぼすかも検討する必要がある。
- 定量 PCR や 16S rRNA 遺伝子に基づく微生物叢解析の前段階である DNA・RNA 抽出の効率や PCR の増幅効率がサンプル間によって異なったため、その違いが結果に影響した可能性も否定できない。特に、春季に採取したサンプルでは PCR の増幅効率が全体的に落ちてしまい、DNA および RNA 由来の相補的 DNA の定量で信頼に足る結果を得ることが出来なかった。技術的な項目であるものの、更なる手法の最適化が必要である。
- 底質に含まれる有機化合物により、どれだけ脱窒反応が進行するのか、長期的な試験により明らかにする必要がある。今回の研究では、外部から有機炭素を供給して潜在的な  $N_2O$  消費活性を評価したものの、底質中の有機物や微生物群の内生呼吸によるその場の  $N_2O$  消費活性も並行して評価することが、 $N_2O$  削減のための戦略を構築する上でも重要である。

## 第 9 章 結果が、どのように社会に還元（活用）されるか

本研究で対象とした  $N_2O$  は二酸化炭素、メタンに次ぐ第 3 の温室効果ガスである。近年では水環境、農地、産業活動からの  $N_2O$  の排出量増大が問題視されており、河川環境での  $N_2O$  排出に関して注意深くモニタリングしていく必要がある。本研究では、河川底質が保有する  $N_2O$  消費のポテンシャルを評価するものであり、河川の  $N_2O$  排出削減につながる基礎的知見となりうる。また、微生物叢の解析を行い、 $N_2O$  消費を担う細菌群の量や種類の結果を得た。引き続き研究を継続する中で、優れた  $N_2O$  消費能力を有する微生物を獲得することが出来れば、河川のみならず産業界、畑地、水田などから排出される  $N_2O$  の削減に利用することが可能となる。

## 謝辞

本研究の遂行にあたり、16S rRNA 遺伝子のアンプリコン解析において、産業技術総合研究所 環境管理研究部門の堀知行 主任研究員、広島大学 大学院先進理工系科学研究科の末永俊和助教（当時、東京農工大学 特任助教）にご指導頂きました。また、東京農工大学の産学官連携研究員の森賀奈子さん、Zhou Yiwen さん、呉中豪さん、当時学生であった豊田りさ子さんのご支援のもと、研究を遂行しました。また、2年間を通して公益財団法人 東急財団の皆様方には、手厚くご支援いただきました。お世話になりました皆様方に厚くお礼申し上げます。

## 参考文献

- Beaulieu, J.J., Tank, J.L., Hamilton, S.K., Wollheim, W.M., Hall, R.O., Mulholland, P.J. et al. (2011) Nitrous Oxide Emission from Denitrification in Stream and River Networks. *Proc Natl Acad Sci* **108**: 214-219.
- Caporaso, J.G., Lauber, C.L., Walters, W.A., Berg-Lyons, D., Lozupone, C.A., Turnbaugh, P.J. et al. (2011) Global Patterns of 16S rRNA Diversity at a Depth of Millions of Sequences Per Sample. *Proc Natl Acad Sci* **108**: 4516-4522.
- Cotto, I., Dai, Z., Huo, L., Anderson, C.L., Vilardi, K.J., Ijaz, U. et al. (2020) Long Solids Retention Times and Attached Growth Phase Favor Prevalence of Comammox Bacteria in Nitrogen Removal Systems. *Water Res* **169**: 115268.
- Daims, H., Lebedeva, E.V., Pjevac, P., Han, P., Herbold, C., Albertsen, M. et al. (2015) Complete Nitrification by Nitrospira Bacteria. *Nature* **528**: 504-509.
- Ferris, M.J., Muyzer, G., and Ward, D.M. (1996) Denaturing Gradient Gel Electrophoresis Profiles of 16S rRNA-Defined Populations Inhabiting a Hot Spring Microbial Mat Community. *Appl Environ Microbiol* **62**: 340-346.
- Hallin, S., Philippot, L., Löffler, F.E., Sanford, R.A., and Jones, C.M. (2018) Genomics and Ecology of Novel N<sub>2</sub>O-Reducing Microorganisms. *Trends Microbiol* **26**: 43-55.
- Henry, S., Bru, D., Stres, B., Hallet, S., and Philippot, L. (2006) Quantitative Detection of the NosZ Gene, Encoding Nitrous Oxide Reductase, and Comparison of the Abundances of 16S rRNA, NarG, NirK, and NosZ Genes in Soils. *Appl Environ Microbiol* **72**: 5181-5189.
- Henry, S., Baudoin, E., Lopez-Gutierrez, J.C., Martin-Laurent, F., Baumann, A., and Philippot, L. (2004) Quantification of Denitrifying Bacteria in Soils by NirK Gene Targeted Real-Time PCR. *J Microbiol Methods* **59**: 327-335.
- IPCC, Edenhofer, O., Pichs-Madruga, R., Sokona, Y., Farahani, E., Kadner, S. et al. (2014) Climate Change 2014: Mitigation of Climate Change. Contribution of Working Group III to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change. *Cambridge University Press*.
- Jones, C.M., Graf, D.R.H., Bru, D., Philippot, L., and Hallin, S. (2013) The Unaccounted yet Abundant Nitrous Oxide-Reducing Microbial Community: A Potential Nitrous Oxide Sink. *ISME Journal* **7**: 417-426.
- Kanehisa, M., and Goto, S. (2000) KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. *Nucleic Acids Res* **28**: 27-30.
- Kits, K.D., Sedlacek, C.J., Lebedeva, E.V., Han, P., Bulaev, A., Pjevac, P. et al. (2017) Kinetic Analysis of a Complete Nitrifier Reveals an Oligotrophic Lifestyle.

- Nature* **549**: 269-272.
- Kits, K.D., Jung, M.-Y., Vierheilig, J., Pjevac, P., Sedlacek, C.J., Liu, S. et al. (2019) Low Yield and Abiotic Origin of N<sub>2</sub>O Formed by the Complete Nitrifier *Nitrospira Inopinata*. *Nat Commun* **10**: 1836.
- Lane, D.J. (1991) 16S/23S rRNA Sequencing. In *E Stackebrandt and M Goodfellow (ed), Nucleic acid techniques in bacterial systematics*, John Wiley & Sons, New York, N Y: 115-175.
- Masuda, S., Otomo, S., Maruo, C., and Nishimura, O. (2018) Contribution of Dissolved N<sub>2</sub>O in Total N<sub>2</sub>O Emission from Sewage Treatment Plant. *Chemosphere* **212**: 821-827.
- Ravishankara, A.R., Daniel, J.S., and Portmann, R.W. (2009) Nitrous Oxide (N<sub>2</sub>O): The Dominant Ozone-Depleting Substance Emitted in the 21st Century. *Science* **326**: 123.
- Rotthauwe, J.H., Witzel, K.P., and Liesack, W. (1997) The Ammonia Monooxygenase Structural Gene *AmoA* as a Functional Marker: Molecular Fine-Scale Analysis of Natural Ammonia-Oxidizing Populations. *Appl Environ Microbiol* **63**: 4704-4712.
- Sanford, R.A., Wagner, D.D., Wu, Q.Z., Chee-Sanford, J.C., Thomas, S.H., Cruz-Garcia, C. et al. (2012) Unexpected Nondenitrifier Nitrous Oxide Reductase Gene Diversity and Abundance in Soils. *Proc Natl Acad Sci* **109**: 19709-19714.
- Suenaga, T., Riya, S., Hosomi, M., and Terada, A. (2018) Biokinetic Characterization and Activities of N<sub>2</sub>O-Reducing Bacteria in Response to Various Oxygen Levels. *Front Microbiol* **9**: (10 pages).
- Suenaga, T., Hori, T., Riya, S., Hosomi, M., Smets, B.F., and Terada, A. (2019) Enrichment, Isolation, and Characterization of High-Affinity N<sub>2</sub>O-Reducing Bacteria in a Gas-Permeable Membrane Reactor. *Environ Sci Technol* **53**: 12101-12112.
- Terada, A. (2017) Breaking Trade-Off in Nitrogen Management and Sustainability. *Clean Technol Environ Policy* **19**: 1993-1994.
- Terada, A., Sugawara, S., Yamamoto, T., Zhou, S., Koba, K., and Hosomi, M. (2013) Physiological Characteristics of Predominant Ammonia-Oxidizing Bacteria Enriched from Bioreactors with Different Influent Supply Regimes. *Biochem Eng J* **79**: 153-161.
- Throbäck, I.N., Enwall, K., Jarvis, Å., and Hallin, S. (2004) Reassessing PCR Primers Targeting *NirS*, *NirK* and *NosZ* Genes for Community Surveys of Denitrifying Bacteria with DGGE. *FEMS Microbiol Ecol* **49**: 401-417.

- Thuan, N.C., Koba, K., Yano, M., Makabe, A., Kinh, C.T., Terada, A. et al. (2018) N<sub>2</sub>O Production by Denitrification in an Urban River: Evidence from Isotopes, Functional Genes, and Dissolved Organic Matter. *Limnology* **19**: 115-126.
- Tian, H., Xu, R., Canadell, J.G., Thompson, R.L., Winiwarter, W., Suntharalingam, P. et al. (2020) A Comprehensive Quantification of Global Nitrous Oxide Sources and Sinks. *Nature* **586**: 248-256.
- van Kessel, M.A.H.J., Speth, D.R., Albertsen, M., Nielsen, P.H., Op den Camp, H.J.M., Kartal, B. et al. (2015) Complete Nitrification by a Single Microorganism. *Nature* **528**: 555-559.
- Yoon, S., Nissen, S., Park, D., Sanford, R.A., and Löffler, F.E. (2016) Nitrous Oxide Reduction Kinetics Distinguish Bacteria Harboring Clade I NosZ from Those Harboring Clade II NosZ. *Appl Environ Microbiol* **82**: 3793-3800.

多摩川底質の亜酸化窒素消費ポテンシャルの体系的評価：  
排水処理施設からの放流水の影響

(研究助成・学術研究 VOL. 50—NO. 360)

著 者 寺田 昭彦

東京農工大学 大学院工学研究院 教授 (採択当時)

発行日 2021年12月

発行者 公益財団法人 東急財団

〒 150-8511

東京都渋谷区南平台町5番6号

TEL (03) 3477-6301

<http://foundation.tokyu.co.jp>